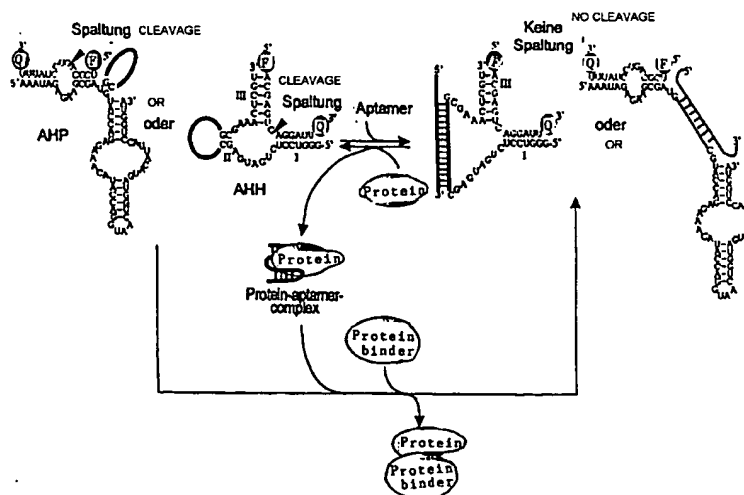




(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/022858 A2

- [Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCREENEN VON INHIBITOREN FÜR DIE PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNG SOWIE RIBOZYME HIERZU



[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/022858 A2



SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt ein allosterisch regulierbares Hairpin-Ribozym. In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung ein Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird und zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist, wobei die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure umfasst. In einem dritten Aspekt betrifft die Erfindung ein Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine katalytische Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird, wobei zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist und die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine zu einer ein Zielmolekül bindenden Nukleinsäure zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure umfasst.

Verfahren zum Screenen von Inhibitoren für die Protein-Protein-Wechselwirkung sowie Ribozyme hierzu

Die vorliegende Erfindung betrifft Polynukleotide umfassend ein Hairpin-Ribozym, diese enthaltende Biosensoren, Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Ribozyme haben seit ihrer Entdeckung sowohl als Werkzeuge in der molekularbiologischen Grundlagenforschung als auch in der potentiellen medizinischen Anwendung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Möglichkeit, Ribozyme endogen oder Exogen in lebende Zellen einzuführen, eröffnet ein großes Potential für deren Anwendung in der Gentherapie, der funktionellen Genomanalyse und der Biotechnologie. Das zu diesen Zwecken am häufigste verwendete Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym (HHR). Hammerhead-Ribozyme sind kleine katalytische RNA-Moleküle, die in der Lage sind, andere RNA-Moleküle intermolekular zu spalten. Die Spezifität dieses Spaltungsprozesses wird bestimmt durch Substrat-Bindungsstellen, die hinsichtlich Sequenz und Länge unterschiedlich sind. Entsprechend kann die Spaltungsaktivität gegen fast eine jede beliebige RNA-Sequenz gerichtet sein (Jenne A. et al., Angew. Chem. Int. Ed. (1999), 38(9), 1300-1303).

Eine Weiterentwicklung der Hammerhead-Ribozyme stellen die sogenannten allosterisch regulierten Hammerhead-Ribozyme dar, d.h. solche Hammerhead-Ribozyme, deren Aktivität in trans, d.h. durch eine mit dem Hammerhead-Ribozym in Wechselwirkung tretende chemische Verbindung, den allosterischen Effektor, beeinflusst werden kann. Allosterische regulierbare Hammerhead-Ribozyme sind typischerweise so aufgebaut, dass sie zum einen eine Ribozym-Domäne und zum anderen ein RNA-Target-Motiv aufweisen. Beide Elemente sind in der Mehrzahl der Fälle mittels eines „RNA-Linkers“ oder einer Brückensequenz miteinander verbunden. Das RNA-Target-Motiv kann mit verschiedenen Verbindungen in Wechselwirkung treten. In dem Fall, dass das RNA-Target-Motiv als Aptamer ausgebildet ist, wird nach Bindung des Zielmoleküls, gegen das das Aptamer gerichtet ist, das Ribozym eine andere Sekundär- bzw. Tertiärstruktur einnehmen und infolge dieser Änderung die katalytische Aktivität des Ribozyms geändert werden. Diese Änderung der katalytischen Aktivität kann dann wiederum detektiert werden (Piganeau, N. et al., Angew. Chem. Int. Ed. (2000), 39(22), 4369-4373).

Eine Anwendung derartiger allosterisch regulierter Hammerhead-Ribozyme ist das Screenen von Verbindungen, insbesondere aus Verbindungsbibliotheken, zu dem Zweck, Verbindungen zu identifizieren, die spezifisch mit dem Zielmolekül wechselwirken, gegen das das RNA-Target-Motiv gerichtet ist. Bei diesem im Stand der Technik bekannten Verfahren wird für den Fall, dass die Verbindung spezifisch mit dem Zielmolekül in Wechselwirkung tritt, das an das Hammerhead-Ribozym, insbesondere an den Aptamer-Teil davon, gebundene Zielmolekül mit der Verbindung in Wechselwirkung treten und vom Ribozym bzw. Aptamer abdissoziieren mit der Folge, dass dieses eine Änderung der Konformation erfährt, die wiederum die katalytische Aktivität des Ribozyms beeinflusst.

Die Herstellung derartiger allosterischer Hammerhead-Ribozyme ist in Folge des durch die Bindung des Zielmoleküls an den Aptamerteil des Ribozyms einhergehenden Konformationsänderung nach wie vor mit einem gewissen Maß an Optimierungsaufwand zur Ermittlung geeigneter RNA-Linker, die auch als Brückensequenzen bezeichnet werden, zwischen dem Aptamerteil und dem Ribozymteil verbunden. Insbesondere muss für jedes Aptamer ein eigenes allosterisch regulierbares Aptamer-Ribozym-Konstrukt entwickelt werden, was den praktischen Nutzen der Konstrukte zum Screening von Verbindungen gegen das Zielmolekül stark einschränkt (G.A. Soukup & R.R. Breaker, *Structure* 7 (1999), 783-791; G.A. Soukup & R.R. Breaker, *PNAS USA* 96 (1999, 3584-358) . Darüber hinaus weisen die Hammerhead-Ribozyme einen vergleichsweise komplexen Aufbau auf, der die katalytische Aktivität des Ribozyms erheblich beeinflusst.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine neue Klasse von Ribozymen bereitzustellen, insbesondere von allosterisch regulierbaren Ribozymen, die einfach zu konstruieren sind. Eine weitere der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, solche Ribozyme bereitzustellen, die leicht an die Erfordernisse eines spezifischen allosterischen Effektors anpassbar sind. Schließlich liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen bereitzustellen, die mit einem Zielmolekül wechselwirken, welches in einem Hochdurchsatz-Format durchgeführt werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch ein allosterisch regulierbares Hairpin-Ribozym.

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß in einem zweiten Aspekt gelöst durch ein Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird, wobei zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist, und wobei die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure umfasst.

Die Aufgabe wird auch erfindungsgemäß in einem dritten Aspekt gelöst durch ein Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine katalytische Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird, und wobei zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist, die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine zu einer ein Zielmolekül bindenden Nukleinsäure zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide ist vorgesehen, dass zumindest an einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure eine dazu zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure hybridisiert ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide ist vorgesehen, dass das Ribozym eine verringerte enzymatische Aktivität aufweist, wenn zumindest an einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure eine dazu zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure hybridisiert ist.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung ist vorgesehen, dass an zumindest einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure das Zielmolekül gebunden ist. Dabei ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass infolge der Bindung des Zielmoleküls das Ribozym eine erhöhte enzymatische Aktivität aufweist.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung ist vorgesehen, dass zumindest an einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure eine dazu zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure hybridisiert ist. Dabei

ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass das Ribozym eine verringerte katalytische Aktivität aufweist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide sowie des erfindungsgemäßen allosterisch regulierten Hairpin-Ribozyms ist vorgesehen, dass ein Substrat an das Polynukleotid gebunden ist, insbesondere an die substratbindende Domäne A.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide sowie des erfindungsgemäßen allosterisch regulierten Hairpin-Ribozyms ist vorgesehen, dass die ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure ein Aptamer ist.

In einer noch weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide sowie des erfindungsgemäßen allosterisch regulierten Hairpin-Ribozyms ist vorgesehen, dass das Polynukleotid oder das allosterisch regulierbare Hairpin-Ribozym eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ.ID.No.1 umfasst und optional weitere Nukleinsäuresequenzen.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung ist vorgesehen, dass das Polynukleotid eine Nukleinsäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID No. 3 und SEQ ID.No. 5 umfasst, umfasst und optional weitere Nukleinsäuresequenzen. Dabei ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass die Brückensequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, die UG – UGC, UGG – GCU, UCGG – GCU und GGUG – UCGU umfasst.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß dem dritten Aspekt der Erfindung ist vorgesehen, dass das Polynukleotid eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID No. 21 und SEQ ID.No. 22 umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide und des erfindungsgemäßen allosterisch regulierten Hairpin-Ribozym ist vorgesehen, dass diese ein Ribozym-Substrat, insbesondere ein FRET-Substrat umfasst.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polynukleotide ist vorgesehen, dass das Polynukleotid und/oder das Ribozym-Substrat RNA, DNA oder Mischungen davon ist.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die hierin beschriebenen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Polynukleotide auch solche des erfindungsgemäßen allosterisch regulierbaren Hairpin-Ribozym sind.

In einem vierten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch einen Biosensor, der ein erfindungsgemäßes allosterisch regulierbares Hairpin-Ribozym und/oder ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Polynukleotid und/oder das Hairpin-Ribozym und/oder das Ribozym-Substrat an einen festen Träger gebunden ist.

In einem fünften Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Polynukleotids gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung oder eines erfindungsgemäßen Hairpin-Ribozyms,
- b) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- c) Hinzugeben einer Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure komplementär ist zu der ein Zielmolekül bindenden Nukleinsäure des Ribozyms,
- d) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- e) Hinzugeben eines Zielmoleküls, wobei das Zielmolekül mit der das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
- f) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- g) Hinzugeben einer Kandidaten-Verbindung,
- h) Bereitstellen eines Substrates für das Polynukleotid und Zugabe des Substrates zu dem Polynukleotid oder dem Reaktionsansatz,
- i) Bestimmen der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül.

In einem sechsten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Polynukleotids gemäß dem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung oder eines erfindungsgemäßen Hairpin-Ribozyms,
- b) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- c) Hinzugeben einer das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure,
- d) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- e) Hinzugeben des Zielmoleküls, wobei das Zielmolekül mit der das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
- f) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- g) Hinzugeben einer Kandidaten-Verbindung,
- h) Bereitstellen eines Substrates für die katalytischen Aktivität des Polynukleotids und Zugabe des Substrates zu dem Polynukleotid oder zum Reaktionsansatz,
- i) Bestimmen der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül.

In einer Ausführungsform der Verfahren nach dem fünften und sechsten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass, dass die Schritte c), e) und g) in ihrer Reihenfolge beliebig ausgetauscht werden können. Generell ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Reihenfolge der einzelnen Schritte vom Fachmann im Rahmen seiner Fähigkeiten geändert werden kann. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung und der vorliegenden Offenbarung, dass die Reihenfolge der im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Verfahren nahezu beliebig gewählt werden kann. Insoweit können die vorstehenden Bezeichnungen a) bis i) die spezifische Reihenfolge der durchzuführenden Schritte definieren, müssen dies jedoch nicht. Im letzteren Falle dienen die Bezeichnungen a) bis i) lediglich der besseren Ansprechbarkeit und Bezugnahme der Einzelschritte.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung und insbesondere auch der erfindungsgemäßen Verfahren, dass die das Zielmolekül (des Aptamers) bindende Nukleinsäure die Domäne C oder einen Teil davon ausbildet bzw. die dazu komplementäre Nukleinsäure (Antisense-Nukleinsäure) die Domäne C oder einen Teil davon ausbildet.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, dass die Bestimmung der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül durch Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms erfolgt.

Dabei ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass das Substrat eine fluorophore und eine fluoreszenzlöschende Gruppe enthält und nach Spaltung des Substrates durch die katalytischen Aktivität des Ribozyms oder der katalytischen Domäne die Löschung der Fluoreszenz unterbunden ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Zielmolekül ausgewählt ist aus der Gruppe, die kleine Moleküle, Polypeptide und Proteine sowie Fragmente davon umfasst.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass das Zielmolekül eine Domäne eines Proteins ist, wobei bevorzugterweise die Domäne eine Wechselwirkung mit einer anderen Verbindung, bevorzugterweise mit einem Polypeptid einem anderen Protein bzw. einer Domäne davon vermittelt.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren ist die Kandidaten-Verbindung ausgewählt aus der Gruppe, die kleine Moleküle, Polypeptide und Proteine sowie Fragmente davon umfasst.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Kandidaten-Verbindung eine Domäne eines Proteins ist, wobei bevorzugterweise die Domäne eine Wechselwirkung mit einer anderen Verbindung, bevorzugterweise mit einem anderen Polypeptid oder mit einem anderen Protein bzw. einer Domäne davon vermittelt.

In einer bevorzugteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die fluorophore Gruppe 6-Carboxy-Fluorescein und die fluoreszenzlöschende Gruppe 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin oder Cy3 ist.

In einem sechsten Aspekt betrifft die vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel umfassend eine nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren identifizierte Verbindung.

In einem siebten Aspekt betrifft die vorliegenden Erfindung einen Kit zur Durchführung eines der erfindungsgemäßen Verfahren, der

- a) ein Polynukleotid gemäß der vorliegenden Erfindung ein erfindungsgemäßes Hairpin-Ribozym; und
- b) ein signalgebendes Ribozym-Substrat

umfasst

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass anstelle der im Stand der Technik beschriebenen Hammerhead-Ribozyme auch Hairpin-Ribozyme in allosterisch regulierbare Ribozyme überführt werden können, die die für die Hammerhead-Ribozyme des Standes der Technik beschriebenen Nachteile überwinden. Dies liegt ganz wesentlich im Aufbau der Hairpin-Ribozyme begründet, die aus mindestens einer Substrat-bindenden Domäne A und einer Domäne B bestehen, wobei durch den Kontakt der Domäne B mit Domäne A die katalytische Aktivität hergestellt wird. Domäne A und Domäne B sind durch eine Domäne C, die hierin auch als Brücken-Sequenz oder Brückendomäne bezeichnet wird, miteinander verbunden. Wird nun, wie seitens der Erfinder überraschend festgestellt, diese Brückendomäne (Domäne C) zumindestens teilweise durch eine ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure ausgebildet, wird damit ein regulatives Element in das Hairpin-Ribozym eingeführt. Der allosterische Effektor für dieses allosterisch regulierbare Ribozym ist dabei das an das Aptamer bindende Zielmolekül. Es wurde festgestellt, dass die Einführung der Domäne C grundsätzlich den Kontakt der Domänen B und A nicht stört und insoweit das Hairpin-Ribozym grundsätzlich auch mit der Domäne C katalytisch aktiv ist.

Mit dem erfindungsgemäßen allosterisch regulierbaren Hairpin-Ribozym und den erfindungsgemäßen Polynukleotiden werden somit Mittel bereitgestellt, um beliebige Aptamersequenzen modularartig und universell mit signalgebenden Ribozymen verknüpfen zu können und um die dabei entstehenden Aptamer-Ribozym-Konstrukte zum Screening von Verbindungen bzw. pharmazeutischen Leitstrukturen zu verwenden.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass unter Hairpin-Ribozymen auch Hairpin-Ribozym-ähnliche Ribozyme verstanden werden. Derartige Hairpin-Ribozym-ähnliche

Ribozyme liegen dann vor, wenn sie den für Hairpin-Ribozyme typischen Mechanismus, insbesondere den hierin beschriebenen, aufweisen. Derartige Hairpin-Ribozym-ähnliche Ribozyme oder Strukturen können entweder durch rationales Design oder im Rahmen von Selektionsverfahren erhalten werden.

Die Brückendomäne kann eine ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure umfassen. Dabei sind derartige Zielmolekül-bindende Nukleinsäure insbesondere RNA- oder DNA-Aptameren, wie sie bspw. beschrieben sind von A. Ellington und J. Szostak (Ellington A.D. et al. *Nature* 346 (1990) 818-822; Tuerk C. et al. *Science* 249 (1990), 505-510). Aptamere sind künstlich selektierte Nukleinsäure mit spezifischen und teilweise hoch-affinen Bindungseigenschaften gegenüber einer Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen (M. Famulok und A. Jenne *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 (1998), 320-327; M. Famulok, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2 (1999), 324-329; S. E. Osborne und A. Ellington, *Chem. Ref.* 97 (1997), 3490-370). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind insbesondere solche Aptamere von Interesse, die gegen biologisch relevante, oftmals im Zusammenhang mit pathologischen Mechanismen stehende Verbindungen wie beispielsweise Proteine gerichtet sind, insbesondere intrazelluläre Peptide und Proteine, aber auch gegen kleine Moleküle (engl. „small molecules“). Dabei ist beachtlich, dass Aptamere grundsätzlich gegen eine jegliche Verbindung hergestellt werden können und die erfindungsgemäß verwendeten Aptamere keine Limitierung im Sinne einer Beschränkung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf bestimmte Zielmoleküle darstellen.

Hairpin-Ribozyme sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt und beispielsweise beschrieben in Burke J.M. in F. Eckstein, D. Lilley (Hrsg.), *Nucleic Acids Mol. Biol.* (1994), 105- 118)

Im Zusammenhang mit der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure ist es für die hierin offenbarte technische Lehre ausreichend, wenn ein Teil derselben die Aptamer-Nukleinsäure, oder einen Teil davon, umfasst. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die die Domäne C ausbildende Nukleinsäure weitere Nukleinsäureteile, d.h. Nukleotide oder Sequenzen, als die Aptamer-Sequenz umfasst. In einer weiteren Ausgestaltungsform umfasst das Polynukleotid ein Substrat für das Hairpin-Ribozym, welches an das Hairpin-Ribozym unter Ausbildung bzw. Vervollständigung von Loop A bindet. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Polynukleotid noch eine weitere Nukleinsäure, die an die Domäne C oder einen Teil davon hybridisiert. Diese weitere Nukleinsäure ist zumindest teilweise zu einem Teil der die

Domäne C ausbildende Nukleinsäure komplementär. Bevorzugterweise handelt es sich dabei um eine Antisense-Nukleinsäure zu der Aptamer-Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotides. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Wechselwirkung zwischen der Aptamer-Sequenz bzw. dem Aptamer-Teil des Ribozyms und dazu korrespondierender Antisense-Sequenz nicht vollständig sein muss. Es kann dabei zur Ausbildung von Ausstülpungen (engl. bulges) oder Schleifen (engl. loops) kommen. Entscheidend ist, dass infolge der Hybridisierung der Antisense-Nukleinsäure an das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Domäne C das Polynukleotid, das allosterisch regulierte Ribozym in eine solche Konformation, mutmaßlich in eine gestreckte Konformation, übergeht und dabei der für die Ausbildung der katalytischen Aktivität erforderliche Kontakt zwischen Domäne A und B nicht mehr erfolgt oder möglich ist und infolgedessen die katalytische Aktivität verringert bzw. vollständig aufgehoben wird. Dabei ist für die Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Änderung der katalytischen Aktivität entscheidend. Insoweit stellt der vorstehend beschriebene Mechanismus keine Einschränkung dar.

Grundsätzlich gelten die gleichen Konstruktionsprinzipien bzw. der gleiche Mechanismus, einschließlich der sich daraus ergebenden Beschränkungen und Erfordernisse an die Komplementarität zwischen Aptamer-Sequenz und Antisense-Sequenz, auch für den zweiten und den dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung betreffend die Ausgestaltung eines allosterisch regulierbaren Hairpin-Ribozyms. Dabei ist im Gegensatz zu dem gemäß dem ersten und dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung beschriebenen allosterisch regulierbaren Hairpin-Ribozym die Sequenz der Domäne C so ausgestaltet, dass sie eine Nukleinsäure enthält, die zumindest teilweise zu der Aptamer-Sequenz komplementär ist, somit eine Antisense-Nukleinsäure zu dem jeweiligen Aptamer oder einem Teil davon darstellt.

Das Substrat der erfindungsgemäßen allosterisch regulierbaren Ribozyme ist ein Signalgebendes Ribozymsubstrat und kann grundsätzlich ein jedes RNA-Molekül sein, das an den Hairpin-Ribozym-Teil der erfindungsgemäßen Polynukleotide spezifisch bindet und von diesen, wenn es seine katalytisch aktive Konformation besitzt, gespalten werden kann und auch einen Nachweis der Spaltung erlaubt. Dies setzt auch voraus, dass das gespaltene Substrat von dem ungespaltenen Substrat unterscheidbar ist und ein unmittelbar messbares Signal erzeugt wird.

Beispielsweise kann das Substrat an einem Ende eine Ankergruppe tragen, die seine Immobilisierung an eine geeignete Matrix erlaubt und an seinem anderen Ende eine Reportergruppe, die zum Nachweis des immobilisierten (ungespaltene) Substrates dient. Bei inaktivem Ribozym bleibt das Substrat intakt und kann nach seiner Immobilisierung auf der Matrix einfach nachgewiesen werden, da die Ankergruppe mit der Reportergruppe nach wie vor verbunden ist. Bei aktivem Ribozym hingegen (d.h. nach Anlagerung des zu identifizierenden Liganden an das RNA-Target-Motiv) ist das Reporter-spezifische Signal nicht nachweisbar, da die Reportergruppe von der Ankergruppe infolge der Spaltung des Substrates getrennt wurde. Alternativ zur Ankergruppe (z.B. Biotin) kann die Immobilisierung des Substrats auch über komplementäre Sequenzhybridisierung erfolgen, sofern Spaltstelle und Reportergruppe jenseits der Hybridisierungsstelle liegen. Einfach nachweisbare Reportergruppen, die leicht an Nukleinsäure-Enden zu koppeln sind, sind beispielsweise ^{32}P , Farbstoff-Moleküle und Moleküle, die mit markierten Antikörpern nachweisbar sind. Das gespaltene Substrat kann aber auch durch eine Reihe von weiteren Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, nachgewiesen werden und dazu zählen z.B. auch Gelelektrophorese und PCR.

Das signalgebende Substrat ist zu der(n) Sequenz(en) der Reporter-Ribozym-Domäne, die für die Substratbindung verantwortlich ist (sind), im wesentlichen komplementär, d.h. es weist eine Komplementarität auf, die eine Anlagerung an das Ribozym auf eine Art und Weise erlaubt, daß eine wirksame und spezifische Spaltung des Substrats gewährleistet ist. Vorzugsweise ist das Substrat zu den für die Substratbindung verantwortlichen Sequenzen des Ribozyms vollständig komplementär. Die Länge des sich anlagernden Bereichs des Substrats beträgt vorzugsweise 8 bis 14 Nucleotide [P. Turner Hrsg., Ribozyme protocols, Humana press (1997), 151-159, 253-264]. Das Substrat kann an seinem 5'- und/oder 3'-Ende zusätzliche Sequenzen enthalten, die nicht an der Anlagerung an das Ribozym beteiligt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das vorstehende Substrat doppelt markiert, wobei das gespaltene Substrat leicht vom intakten Substrat unterscheidbar ist. Zum Beispiel kann ein endständig biotinyliertes Substrat verwendet werden, das an seinem anderen Ende mit Fluorescein markiert ist. Nach erfolgter Reaktion wird anschließend mit einer Streptavidin-beschichteten Festphase (z.B. mit einer kommerziell erhältlichen Mikrotiterplatte) inkubiert, um die Kopplung des biotinylierten Substrat-Endes an die Streptavidin-Matrix zu ermöglichen. Nach Waschen der Matrix wird diese vermessen. Bei Anwesenheit eines spezifisch an das RNA-

Target-Motiv bindenden Liganden (Reporter-Ribozym-Domäne ist aktiviert) ist keine Fluorescein-spezifische Fluoreszenz bzw. nur eine schwache unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz meßbar, da das Fluorescein-markierte Spaltstück nicht immobilisiert werden konnte. Erfolgte dagegen keine Aktivierung des Reporter-Ribozym-Konstrukts durch das Fehlen eines spezifisch an das RNA-Target-Motiv bindenden Liganden, kann der Anteil an ungespaltenem, immobilisiertem Substrat durch Messung der Fluorescein-spezifischen Fluoreszenz quantifiziert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das doppelt markierte Substrat eine fluorophore Gruppe und eine fluoreszenzlöschende Gruppe, wobei nach Spaltung durch die Reporter-Ribozym-Domäne die Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors durch die fluoreszenzlöschende Gruppe unterbunden ist. Solchermaßen markierte Substrate können z.B. in dem FRET-Verfahren [FRET = Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescent Spectroscopy; Plenum Press, New York (1983))] verwendet werden. FRET-Oligonucleotide sind z.B. in K.J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, PCR Meth. Appln. 4 (1995), 357-362 beschrieben.

Als FRET-Substrat besonders bevorzugt sind RNA-Oligonucleotide oder DNA-RNA-Hybride in denen eine fluorophore Gruppe (z.B. FAM = 6-Carboxy-Fluorescein, TET = Tetrachloro-6-Carboxy-Fluorescein oder HEX = Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein) und eine entsprechende fluoreszenzlöschende Gruppe, ein sog. "Quencher" (z.B. Sulforhodamin 101 oder TAMRA = 6-Carboxy-TetramethylRhodamin), in räumlicher Nähe so angebracht sind, daß es zur effektiven Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors kommt [Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York (1983), 303-339; V. Förster, Annals of Physics (Leipzig) 2 (1948), 55-75]. Nach Spaltung des Substrates durch Ribozym-katalysierte Hydrolyse einer bestimmten Phosphodiester-Bindung können sich die Spaltstücke in Lösung voneinander entfernen: Die Fluoreszenz des Fluorophors wird nun nicht mehr intramolekular gelöscht. Lagert sich also ein geeigneter Ligand an das RNA-Target-Motiv an, was zu einer biologisch aktiven Reporter-Ribozym-Domäne führt, so kann dies dadurch bestimmt werden, daß mit Spaltung des Substrates ein messbares Fluoreszenz-Signal erzeugt wird. Das auf der FRET-Technologie basierende erfindungsgemäße Verfahren ist für das industrielle Hochdurchsatz-Screening von Substanzbibliotheken besonders geeignet, da es einfach durchführbar und leicht auf verschiedene Microtiterplatten-Formate adaptierbar ist [X. Chen et al., Genome Res. 8 (1998), 549-556; K.P.

Bjornson et al., *Biochemistry* 33 (1994), 14306-14316; A.R. Gelsthorpe et al., *Tissue Antigens* 54 (1999), 603-614; J.E. Gonzalez et al., *Drug Discov. Today* 4 (1999), 431-439]. Insbesondere werden radioaktive Abfälle vermieden, die ansonsten kostenintensiv entsorgt werden müßten. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat darüber hinaus den Vorteil, die Bindung eines Liganden sehr sensitiv zu erfassen, da die katalytische Spaltung des FRET-Substrats zu einer deutlichen Signalverstärkung führt [bezüglich der Bestimmung der Spaltungsaktivität von Hammerhead-Ribozymen in sehr kurzer Zeit durch Fluoreszenzmessung im Microtiterplatten-Format siehe auch Jenne et al., *Angew. Chem.* 111 (1999), 1383-1386.]. Vorzugsweise ist die auf der FRET-Technologie basierende Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens so konzipiert, daß anfänglich, also vor dem zu messenden Bindungs- bzw. Verdrängungsereignis, kein oder nur ein sehr kleines Signal gemessen wird und erst infolge der Bindung bzw. Verdrängung eine deutliche Veränderung des Fluoreszenzsignals eintritt. Dies kann vor allem durch die Wahl eines geeigneten RNA-Linkers, der die RNA-Target-Sequenz mit der Ribozym-Domäne verbindet, erreicht werden (siehe oben). Methoden zur Markierung von Ribonucleinsäuren mit fluorophoren bzw. fluoreszenzlöschenden Gruppen sowie Techniken zur Messung des Energietransfers (Quenching) wurden bereits detailliert beschrieben [Turner (Hrsg.), *Ribozyme protocols*, Humana press (1997), 241-251]. 5'-Fluorophor- und 3'-Quencher-markierte RNA-Oligonucleotide sind kommerziell erhältlich (z. B. 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierte RNA bei Eurogentec, Belgien). Die Markierung erfolgt günstigerweise an den RNA-Enden, um die Hybridisierung an die Reporter-Ribozym-Domäne nicht zu beeinflussen.

Um die mit unerwünschter Spaltung (z.B. durch Nucleasen im Transkriptionssystem) einhergehende Fluoreszenz-Emission zu vermeiden, ist insbesondere der Einsatz Nuclease-resistenter Substrate von Vorteil (Eaton und Pieken, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995), 837-863 und Shimayama et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (1993), 2605-2611). Dies ist vor allem im Hinblick auf in vivo-Anwendungen von Vorteil, bei denen das doppelt markierte Substrat durch geeignete Techniken (z.B. Mikroinjektion, Liposomentransport, etc.) Exogen in Zellen eingeschleust wird (P. Turner (Hrsg.), *Ribozyme protocols*, Humana press (1997), 417-451). Somit handelt es sich in einer besonders bevorzugten Ausführungsform bei den doppelt markierten Substraten um modifizierte RNA-Oligonucleotide. Solange die Spaltstelle im Substrat NUH ↓, (nach IUB Code.: N = jede Base, H = A, U oder C) lautet, kann das Substrat Desoxyribonucleotide oder/und modifizierte Basen oder/und 2'-modifizierte Riboseeinheiten enthalten. Dadurch wird die

Stabilität des Substrates im Zellextrakt erhöht (N. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 20 (1992), 4559-4565). Auch kann die Verwendung von intern-markierten, statt end-markierten Oligonucleotid-Substraten zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis beitragen, da die Fluoreszenzlöschung u. a. mit kürzeren Abständen zwischen den beiden Gruppen (Fluorophor und Quencher) verstärkt wird.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten Polynukleotide sowie Substrate werden vorzugsweise durch in vitro-Transkription der entsprechenden DNA-Sequenzen in größeren Mengen hergestellt. Dazu werden diese DNA-Sequenzen in einen Vektor inseriert, der die Vermehrung der inserierten DNA in einem geeigneten Wirt erlaubt, unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, vorzugsweise des T7-Promotors. Geeignete Vektoren für die Vermehrung in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen sind dabei z.B. pBR322, pNEB193, pUC18, pUC19 (Biolabs, USA.) [J. Sampson und O. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 1033-1037]. Anschließend werden die Plasmide isoliert, gereinigt und die in vitro-Transkription wird gemäß Standardverfahren durchgeführt. Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Konstrukte können aber auch durch automatisierte Festphasensynthese gemäß Standardverfahren hergestellt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die ein Zielmolekül bindet, kann es sich prinzipiell um jede beliebige Verbindung handeln, wobei diese zu den unterschiedlichsten Verbindungstypen zählen können, und der Fachmann kennt auch eine Vielzahl von Quellen, die für das erfindungsgemäße Screening-Verfahren geeignete Verbindungen enthalten. Prinzipiell eignet sich z.B. alle denkbaren Substanz-Bibliotheken inklusive Antisense-Nukleinsäuren; bevorzugt sind jedoch Bibliotheken mit niedermolekularen Molekülen, die bestimmte Voraussetzungen erfüllen, wie sie letzten Endes, zumindestens teilweise, auch an pharmazeutisch aktive Verbindungen gestellt werden, bspw. hinsichtlich ihrer geringen Toxizität [D.J. Ecker & R.H. Griffey, *Drug Disc. Today* 4 (1999), 420-429]

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, ist es grundsätzlich möglich, dass das Zielmolekül auch ein Polypeptid oder ein Protein, insbesondere eine Domäne davon, darstellt. Bei dem Protein bzw. der Domäne davon ist es wiederum besonders bevorzugt, wenn diese eine solche ist, die die Wechselwirkung mit einem anderen Molekül vermittelt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dabei

vorgesehen, dass das andere Molekül, d. h. die Kandidaten-Verbindung, die an das Zielmolekül bindet wiederum ein Polypeptid oder ein Protein bzw. eine Domäne davon ist. In einem solchen Fall ist es somit unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, möglich, Protein-Protein-Wechselwirkungspartner zu ermitteln und insoweit die im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie beispielsweise das Two-Hybrid-Verfahren, zu ersetzen und die diesem inhärenten Nachteile zu überwinden.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Ribozym-Substrat für die katalytische Aktivität des Ribozyms kovalent an das Ribozym oder das Aptamer bzw. die Antisense-Nukleinsäure zu dem Aptamer umfassenden Polynukleotid gemäß einem der Aspekte der vorliegenden Erfindung gebunden ist und somit die katalytische Reaktion des Ribozyms eine intramolekulare Reaktion ist. Die Bindung mittels derer Ribozym-Substrat und Ribozym miteinander verbunden sind, ist typischerweise eine internukleosidische Bindung, die an einem jeglichen der beiden Enden des Ribozyms bzw. des Ribozym-Substrates ebenso vorhanden sein kann, wie innerhalb der das Ribozym bzw. der das Ribozym-Substrat aufbauenden Nukleinsäuresequenz. Bei einer derartigen Ausgestaltung des Ribozyms vereinfachen sich die Schritte der erfindungsgemäßen Verfahren dahingehend, dass eine getrennte Bereitstellung des Ribozym-Substrats entfällt bei ansonsten Beibehaltung der anderen, die erfindungsgemäßen Verfahren kennzeichnenden Schritte.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Arzneimittel, das eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierte Verbindung enthält. Dazu zählt auch eine davon abgeleitete Verbindung, die ebenfalls an das RNA-Target-Motiv binden kann, wobei diese Verbindung z.B. nur den Anteil oder die Teilsequenz der ursprünglich identifizierten Verbindung enthält oder einen davon abweichenden Anteil oder abweichende Teilsequenz, deren Affinität zu dem RNA-Target-Motiv gegenüber der ursprünglichen Verbindung verändert, vorzugsweise erhöht ist. Vorzugsweise ist das Arzneimittel mit einem geeigneten Träger kombiniert. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele veranschaulicht, aus denen sich weitere Merkmal, Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung ergeben. Dabei zeigt

- Fig. 1 die Sekundärstruktur des bimolekularen Hairpin-Ribozyms, welches die Grundlage für die Konstruktion der verschiedenen erfindungsgemäßen allosterischen Hairpin-Ribozyme darstellt;
- Fig. 2 ein erfindungsgemäßes allosterisches Hairpin-Ribozym, dessen Brückenregion durch ein FMN-spezifisches Aptamer ausgebildet wird;
- Fig. 3 die Sequenz und Sekundärstruktur des FMN-spezifischen Aptamers;
- Fig. 4 den Aufbau eines durch ein für FMN spezifisches Aptamer regulierten Hairpin-Ribozyms;
- Fig. 5 die Sekundärstruktur eines durch ein für ATP spezifisches Aptamer reguliertes Hairpin-Ribozym;
- Fig. 6 die Sequenz und die Sekundärstruktur eines ATP-Aptamers;
- Fig. 7 den Aufbau eines durch ein für ATP spezifisches Aptamer regulierten Hairpin-Ribozyms;
- Fig. 8 die Sequenz des für die erfindungsgemäßen allosterischen Ribozyme verwendeten Substrates;
- Fig. 9 die Primär- und Sekundärstruktur eines weiteren durch ein für FMN spezifisches Aptamer regulierten Hairpin-Ribozyms;
- Fig. 10 eine Darstellung des Wirkmechanismus eines durch einen antisense-Mechanismus allosterisch regulierten Hairpin-Ribozyms;

- Fig. 11 eine Darstellung des Wirkmechanismus von durch einen Antisense-Mechanismus allosterisch regulierten Hairpin-Ribozymen, ergänzt durch den Vorgang der Bindung des für das Aptamer-spezifischen Zielmoleküls;
- Fig. 12 eine schematische Darstellung eines FRET-Substrates mit einer entsprechenden Primärsequenz;
- Fig. 13 verschiedene Antisense-Oligonukleotide zu dem FMN-spezifischen Aptamer;
- Fig. 14 das Ergebnis einer kinetischen Analyse eines erfindungsgemäßen Antisense-regulierten Hairpin-Ribozymen;
- Fig. 15 den Wirkmechanismus eines Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozymen;
- Fig. 16 verschiedene Paare zwischen im Hairpin-Ribozym enthaltenen Antisense-Nukleinsäuren und hierzu, zumindest teilweise, komplementären Aptamer-spezifischen Nukleinsäuren;
- Fig. 17 das in Fig. 15 für FMN als Zielmolekül dargestellte Verfahren für Thrombin;
- Fig. 18 die Sequenzen zweier durch Thrombin-Aptamere regulierte Antisense-Hairpin-Ribozyme;
- Fig. 19 die Ausgestaltung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Identifizierung von potentiellen Wirkstoffen unter Verwendung von Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozymen;
- Fig. 20 die Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, zeigt, wobei das Zielmolekül ein Protein ist und mittels des Verfahrens Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht bzw. Protein-Wechselwirkungspartner bestimmt werden können; und

Fig. 21 das Ergebnis von Protein-Protein-Wechselwirkungen von α -Thrombin und Hirudin unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ausgedrückt als Fluoreszenz/min zeigt, wobei das Ergebnis in Fig. 21 A unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Hairpin Ribozyms ermittelt wurde und das Ergebnis von Fig. 21 B unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Hammerhead-Ribozyms ermittelt wurde.

Fig. 22 das Ergebnis einer Spezifitätsanalyse unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Hairpin Ribozyms. Die Aktivität des durch das Thrombin-Aptamer inhibierten AHP-Konstrukts wird nur durch die Bindung des Aptamers an Thrombin und die damit verbundene Ablösung des Thrombin-Aptamers vom AHP-Konstrukt wiederhergestellt (Reihe 3, AHP-Thr/apt: +/+). Keine Wiederherstellung der Aktivität wird in Anwesenheit von Kontrollproteinen (Reihe 1, 2, 4 bis 12; AHP-Thr/apt: +/-) beobachtet.

Beispiel 1: Konstruktion eines durch ein für FMN-spezifisches Aptamer reguliertes Hairpin-Ribozym.

Dieses Hairpin-Ribozym wurde konstruiert ausgehend von dem in Fig. 1 zusammen mit seinem Substrat, welches mit Kleinbuchstaben bezeichnet wird, dargestellten bimolekularen Hairpin-Ribozym. Die Sequenz des eigentlichen Hairpin-Ribozyms, das heißt ohne die Substratsequenz, ist in SEQ ID No 1 dargestellt, die Sequenz des Substrates als SEQ ID No 2.

Die in Fig. 1 dargestellte Struktur des bimolekularen Hairpin-Ribozyms zeigt eine Reihe von Modifikationen, die gegenüber dem Wildtyp Hairpin-Ribozym (wtHpRz) vorgenommen wurde. So ist die Helix 4 (H4) durch Hinzufügen von drei Basenpaaren verlängert und durch einen stabilen GUAA-Tetraloop ergänzt, um Loop B zu stabilisieren. Weiterhin enthält das Konstrukt eine U39C Mutation, welche die Umsatzrate des Ribozyms erhöht. Weiterhin wurden insgesamt drei Basenpaare, eine in H1 und zwei in H2, in Fig. 1 angegeben durch eine graue Schattierung, geändert, um die Selbstkomplementarität des Substrates zu minimieren. Die Spaltungsstelle zwischen den Resten A-1 und G+1 ist mit einem Pfeil bezeichnet, der Rest des Ribozyms ist ansonsten identisch mit dem Wildtyp-Ribozym.

Ausgehend hiervon wurde zwischen den Positionen 14 und 15 das Nukleotidpaar GU eingeführt, das somit das Interface zwischen Helix H2 und Helix H3 ersetzt. An dieses Konstrukt wurde sodann das FMN-bindende Aptamer (Burgstaller und Famulok, 1994) gebunden. Das Konstrukt ist schematisch in Fig.2 angegeben. Dabei bezeichnet FMN das in Fig.3 angegebene FMN-bindende Aptamer (SEQ ID No. 6) (21 Nukleotide). In der in Fig. 2 gezeigten Struktur, die hierin auch als F80 bezeichnet wird, sind die am Ende der kreisförmigen Linie angegebenen Nukleotide A und G das 5'-bzw. 3'- Ende des Aptamers. Ein derartiges Konstrukt, bestehend aus einem Hairpin-Ribozym, optional einer Brückensequenz, sowie einem Aptamer, wird hierin auch als Hairpin-Aptazym bezeichnet. Das FMN-spezifische Aptazym ist als SEQ ID No. 3 hierin bezeichnet, eine grundsätzliche schematische Struktur nochmals in Fig. 4 dargestellt. In Fig. 4 sind die Sequenzbrücken unterstrichen. Die Pfeile in Fig. 2 zeigen die Stelle der Ribozym-vermittelten Spaltung. Das terminale GC-Basenpaar des Aptamers, in Fig. 3 mit einem (*) bezeichnet, stellen Wechselwirkungen dar, die durch Liganden-Bindung stabilisiert sind.

Der vorstehend beschriebenen Konstruktion lag die Überlegung zugrunde, daß in Folge der Brückensequenz die koaxiale Überlagerung der Helices H2 und H3 inhibiert und die gebogene Konformation (engl. bent conformation) in Gegenwart des Zielmoleküls favorisiert wird.

Beispiel 2: Konstruktion eines durch ein für ATP-spezifisches Aptamer reguliertes Hairpin-Ribozym.

Wiederum ausgehend von dem in Fig. 1 dargestellten bimolekularen Hairpin-Ribozym Konstrukt wurde ein ATP-bindendes Hairpin-Ribozym konzipiert, bei dem zwischen dem Nucleotid 14 und 15 dem in Fig. 1 dargestellten und in Beispiel 1 beschriebenen Hairpin-Ribozym eine Sequenzbrücke eingeführt wurde, die im vorliegenden Falle aus vier GU-wobble-Basenpaaren besteht. Das Konstrukt ist als Fig. 5 dargestellt, wobei die ATP-spezifische Aptamer-Sequenz als Kreis dargestellt ist, und die Nukleotide G und C das 5'- und das 3'- Ende des in Fig. 6 dargestellten ATP-Aptamers darstellen. Dies hierin auch als Konstrukt AT 1 bezeichnete ATP-spezifische Hairpin-Aptazym ist schematisch nochmals in Fig. 7 dargestellt, wobei die unterstrichenen Nukleotide die Sequenzbrücken darstellen. Das terminale GC-Basenpaar des Aptamers stellen durch Liganden-Bindung stabilisierte Wechselwirkungen dar. Die Aptamer-

Sequenz ist in SEQ ID No. 4 und die Sequenz des als AT 1 ATP-bindenden Aptazyms als SEQ ID No. 5 gestellt.

Beispiel 3: Kinetische Analyse der Hairpin-Aptazyme

Die in den Beispielen 1 und 2 hergestellten allosterischen Hairpin-Aptazyme wurden einer kinetischen Analyse unterzogen. Die Reaktionsbedingungen waren dabei wie folgt.

Einzelumsatzbedingungen (single turn-over condition (STO)):

Ribozym und Substrat werden getrennt für 10 Minuten bei 37°C in jeweils 25 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris HCl, pH 7,5, 20 mM MgCl₂) präinkubiert. Nach Hinzugeben der Effektoren, im vorliegenden Falle von FMN oder ATP, wurde für 10 Minuten bei 24°C äquilibriert. Die Reaktion wurde initiiert durch Mischen gleicher Flüssigkeitsvolumina (insgesamt 50 µl). Aliquots der Reaktion (5 µl) wurden über einen Zeitraum von 0 bis 60 Minuten entfernt und mit einem gleichen Volumen Beladungspuffer (15mM EDTA, 97% Formamid) gelöscht. Die Analyse der Proben erfolgte in 20 % Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese. Die Konzentration des Ribozyms betrug 200 nM, des Substrates 1 bis 2 nM.

Bedingungen für Mehrfachumsatz (multiple turn-over condition (MTO)).

Das Ribozym wurde für 10 Minuten bei 37°C im Reaktionspuffer (s.o.) präinkubiert. Nach Zusetzen der Effektoren, im vorliegenden Falle FMN oder ATP, ließ man den Reaktionsansatz für 10 Minuten bei 24 °C äquilibrieren. Die Reaktion wurde gestartet durch Mischen gleicher Flüssigkeitsvolumina aus FRET-markiertem Substrat in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Reaktion wurde sodann in Echtzeit verfolgt. Die Konzentration des Ribozyms betrug dabei 40-50 nM. Die Konzentration des Substrates betrug 100 – 3000 nM. Die kinetische Analyse wurde unter Verwendung von F80 (das in Beispiel 1 beschriebene FMN-regulierte Aptazym), AT1 (das in Beispiel 2 beschriebene ATP-regulierte Aptazym) und des in Fig. 1 dargestellten modifizierten Wildtyp-Hairpin-Ribozyms durchgeführt. Die Substratspaltungsreaktionen wurden unter Substrateinzelumsatzbedingungen in Abwesenheit, oder in Gegenwart des jeweiligen Effektormoleküls (im vorliegenden Falle FMN oder ATP) unter Verwendung von 200 nM Ribozym und 2 nM 5'-radioaktiv markierten synthetischen RNA-Substrat (14 Basen) durchgeführt. Das Substrat entspricht SEQ ID No. 2 und ist als Fig. 8 nochmals dargestellt.

Weiterhin wurde auf der Grundlage dieser kinetischen Analyse die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} (min^{-1}) bestimmt, die in Tabelle 1 zusammengefasst ist.

Konstrukt	Brückensequenz	k_{obs} (min^{-1})		
		Kein Zusatz	ATP	FMN
wtHpRz	-	0.098	0.10	0.098
AT1	GUGU UGUG	0.17	0.16	-
F80	G U	0.15	-	0.16

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß bei dem modifizierten Wildtyp-Hairpin-Ribozym gemäß Fig. 1 die Zugabe von ATP bzw. FMN faktisch zu keiner signifikanten Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} führte. Im Falle des ATP-spezifischen Aptazyms AT 1 veränderte der Zusatz von ATP die Geschwindigkeitskonstante nur in nicht-signifikanter Weise. Gleiches gilt für das FMN-Aptazym F80. Es ist jedoch beachtlich, daß durch die Einführung der Brückensequenz im Falle von AT 1 umfassend 4 wobble-Basenpaare, im Falle von F80 umfassend eine wobble-Base, sich die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} verdoppelte.

Aufgrund der beobachteten Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} um den Faktor 2 wird, ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, angenommen, daß die Modifikation der Wildtypstruktur des Hairpin-Ribozyms durch die Brückensequenzen die anisotrope Flexibilität der Übergangsregion zwischen Loop A und Loop B initiiert, die vorhanden sein könnte, um eine funktionale Wechselwirkung zwischen den beiden Loop-Domänen zu ermöglichen, und bevorzugterweise die gebogene Konformation (engl. bent conformation) verglichen mit der coaxialen Übereinanderlagerung induziert.

Beispiel 4: Konstruktion von Hairpin-Aptazym mit erhöhter allosterischer Induktion.

Ausgehend von dem in Beispiel 1 beschriebenen FMN-bindenden Aptazym F80 wurde ein neues FMN-spezifisches Aptazym konstruiert, welches sich von der in Fig. 1 dargestellten Struktur und der als SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz lediglich dadurch unterscheidet, daß zwischen den

Nukleotidpositionen 14 und 15 die Sequenz UG-CGU (in der Folge 5'-3')- und die für FMN-spezifische Aptamersequenz gemäß SEQ ID No. 6 mit dem 5'-Ende (A) an das vorstehend erstgenannte Guanin und das 3'-Ende des besagten Aptamers (G) an das vorstehend genannte Cytosin gebunden wird. Die Struktur des solchermaßen erhaltenen FMN-spezifischen Aptazym ist in Fig. 9 dargestellt und wird hierin auch als F83 bezeichnet.

Ausgehend von F83 wurde sodann die Brückensequenz verändert und die Auswirkungen dieser Änderungen auf die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} (min^{-1}) bestimmt. Für die Konstruktion dieser FMN-spezifischen Aptazyme wurde dabei die Überlegung herangezogen, daß Induktionselemente bei der Ausgestaltung von allosterischen Ribozymen von zentraler Bedeutung sind, wie es früher für die Hammerhead-Ribozyme bereits gezeigt wurde. Gegenüber dem bereits von Soukup und Breaker vorgeschlagenen „slip-structure“ Mechanismus wurde im vorliegenden Falle ein Mechanismus modelliert, der die Inhibierung der Ausbildung des Loops A, bevorzugterweise vor der Ligandenbindung, umfaßt. Im Falle des FMN-bindenden Aptamers besteht die für den vorgeschlagenen Mechanismus der allosterischen Induktion kritische Komponente in dem einzigen gemeinsamen AG-Basenpaar, das innerhalb der Aptamer-Domäne in Nachbarschaft zur Brückensequenz angeordnet ist, die sich nur ausbildet, wenn FMN gebunden wird. Insgesamt wurden sieben verschiedene symmetrische und unsymmetrische Brückenelemente erzeugt und hinsichtlich ihrer allosterischen Reaktion untersucht. Fünf der sieben Konstrukte zeigten eine offenkundige Erhöhung der katalytischen Rate. Die Ergebnisse, sowie die Ausbildung der verschiedenen Brückensequenzen, sind in Tabelle 2 dargestellt. Die eine erhöhte katalytische Rate aufweisenden Konstrukte sind mit einem (*) markiert.

Tabelle 2

Konstrukt	Brückensequenz	k_{obs} (min ⁻¹)	
		Kein Zusatz	FMN
F83*	UG UGC	0.09	0.20
F84*	UGG GCU	0.086	0.21
F85*	UCGG GCU	0.05	0.17
F86*	GUGG CGCU	0.15	0.16
F87*	UG CGC	0.16	0.19
F88*	GGUG UCGU	0.07	0.14
F89*	CUA CGCU	0.14	0.16

Beispiel 5: Funktionsweise von Antisense-regulierten Hairpin-Ribozymen.

Weiterhin wurde ein katalytisches Hairpin-Ribozym konzipiert, das einer allosterischen Regulation durch einen antisense-Mechanismus unterliegt.

Das Prinzip dieser Art von Hairpin-Ribozym zugrunde liegende Mechanismus der allosterischen Inhibition ist in Fig. 10 dargestellt.

Ausgehend von einem Hairpin-Ribozym (1) wird ein geeignetes Substrat zu dem Reaktionsansatz zugegeben (2) und somit die grundsätzliche in Fig. 2 oder Fig. 5 beispielhaft dargestellte Struktur eines Aptamer-tragenden Ribozyms, das heißt eines Aptazyms, erzeugt. Die Verbindung zwischen Loop A und Loop B erfolgt durch die Sequenz des Aptamers. Durch Zugabe eines Oligomers, welches zumindest teilweise komplementär zu der Aptamer-spezifischen Nukleinsäuresequenz oder einen Teil davon, ist, kommt es nach der Annelierung des Oligomers zu einer gestreckten Konformation und damit zu einer spezifischen Deaktivierung der katalytischen Aktivität des Ribozyms (3).

Ausgehend von dem in Beispiel 4 offenbarten FMN-spezifischen Aptazym F83 wurden sodann Versuche durchgeführt, wie sie beispielhaft für das Oligonukleotid ION 21 in Fig. 11 dargestellt sind. Dabei korrespondieren die Schritte (1), (2) und (3) zu den Schritten (1), (2) und (3) von Fig. 10. Ausgehend von der gestreckten Konformation des Aptazyms (3) wird sodann FMN hinzugegeben, welches das Oligonukleotid ION 21, welches komplementär zu der im Aptazym enthaltenen, zwischen Loop A und Loop B angeordneten Aptamer-Sequenz ist, freisetzt. In Folge dessen geht das FMN-spezifische Aptamer, welches FMN in seiner Aptamer-spezifischen Domäne gebunden aufweist, in eine Konformation über, in der die katalytische Aktivität des Ribozyms vorhanden ist und in Folge dessen ein anneliertes Substrat, beispielsweise das in Fig. 8 oder Fig. 12 dargestellte Substrat, umgesetzt wird und sodann mit dem allgemeinen FRET-Mechanismus eine Fluoreszenzemission gemessen werden kann.

Weitere Oligonukleotide, die als Antisense-Oligonukleotide verwendet werden können, um eine gestreckte Konformation des Aptazyms und damit das Inhibieren der Ribozym-Aktivität bedingen können, sind in Fig. 13 dargestellt. Dabei ist das Oligonukleotid ION 21 (SEQ ID No. 7) vollständig komplementär zu der im Aptazym enthaltenen FMN-Aptamer-Sequenz, ION 14 umfaßt 7 Fehlpaarungen, die in Fig. 13 (SEQ ID No.8) mit Pfeilen markiert sind. ION 17 (SEQ ID No. 9) umfaßt vier Fehlpaarungen, die in Fig. 11 mit Pfeilen bezeichnet sind.

Beispiel 6: Kinetische Analyse der allosterischen Regulation eines Hairpin-Ribozyms.

Das in Beispiel 5 beschriebene Antisense-regulierte Hairpin-Ribozym wurde unter Verwendung von ION 21 als Effektormolekül einer kinetischen Analyse unterzogen. Das Ergebnis ist in Fig. 14 dargestellt. Die Reaktionsbedingungen entsprechen den in Beispiel 3 angegebenen Reaktionsbedingungen.

Wie aus Fig. 14 ersichtlich, inhibiert ION 21 die Ribozymaktivität vollständig bei einem Verhältnis von 1:4.5, die jedoch durch Zugabe von 1 mM FMN (Sigma) mit einem Verstärkungsfaktor von etwa 1000 wiederhergestellt werden kann.

Beispiel 7: Konstruktion von Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozymen.

Ausgehend von dem in Fig. 1 dargestellten bimolekularen Hairpin-Ribozym wurde ein weiteres Hairpin-Ribozym hergestellt, welches sich dadurch auszeichnet, daß an Stelle des Aptamers eine zum Aptamer komplementäre Nukleinsäuresequenz zwischen dem Loop A und Loop B an der bekannten Stelle, nämlich zwischen dem Nukleotid 14 und 15, eingefügt wurde. Der Funktionsmechanismus dieser neuen Art von Hairpin-Ribozymen ist schematisch in Fig. 15 dargestellt.

Ein biomolekulares Hairpin-Ribozym, beispielsweise das in Fig. 1 dargestellte, ist als (1) gezeigt. Das verwendete Substrat, beispielsweise das in Fig. 8 bzw. Fig. 12 gezeigte FRET-Substrat wird unter diesen Bedingungen gespalten. In die Region zwischen Loop A und Loop B wird sodann eine Nukleinsäure eingefügt, deren Sequenz im wesentlichen komplementär ist zur Sequenz eines Aptamers. Diese zumindest teilweise Komplementarität beinhaltet, daß die eingefügte Nukleinsäure einen Teil der komplementären Sequenz umfaßt, oder neben der vollständigen Aptamer-komplementären Sequenz noch weitergehende Sequenzelemente, insbesondere am 5'- bzw. 3'- Ende der eingefügten komplementären Sequenz aufweist. Darüber hinaus ist es auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß die eingefügte Sequenz nur teilweise komplementär ist zu der Aptamer-spezifischen Sequenz. Dies bedeutet in einem jeden Fall, daß bei Paarung zwischen der eingefügten komplementären Sequenz und der Aptamer-Sequenz Fehlpaarungen auftreten können. Auch in dieser Form ist das Ribozym katalytisch aktiv (2). In einem weiteren Schritt (3) wird sodann durch das spezifische Aptamer, im vorliegenden Falle beispielhaft veranschaulicht durch ein FMN-Aptamer, genauer durch Annelieren des Aptamers an die im Ribozym enthaltene antisense-Nukleinsäure, die Sekundär-Tertiärstruktur des Hairpin-Ribozyms dahingehend geändert, daß dieses eine gestreckte Konformation einnimmt und in Folge dessen die katalytische Aktivität des Ribozyms verringert bzw. vollständig inhibiert wird. Die Tatsache, daß das Aptamer und die zwischen Loop A und Loop B eingefügte Sequenz (Anti-APT) nicht vollständig komplementär sind, äußert sich beispielsweise in (3) dadurch, daß sich hier einige Fehlpaarungen bzw. Ausstülpungen (bulbs) oder Schleifen (loops) ausbilden. Bei Zugabe des Zielmoleküls des Aptamers, im vorliegenden Falles von FMN, kommt es zu einer spezifischen Wechselwirkung der an dem Hairpin-Ribozym annelierten Aptamer-Nukleinsäure und dem Zielmolekül FMN, wodurch das Ribozym wieder von der gestreckten Konformation in

jene Konformation übergeht, bei der das Ribozym katalytisch aktiv ist. Entsprechend wird in (4) wiederum das Substrat gespalten.

Es ist für den Fachmann offensichtlich, daß eine Vielzahl von konkreten Sequenzpaarungen zwischen der eingefügten Aptamer-komplementären Sequenz (antisense-Nukleinsäure) und dem Aptamer selbst möglich sind. Voraussetzung ist in einem jeden Fall, daß auf Seiten der zum Aptamer komplementären, im Hairpin-Ribozym enthaltenen Nukleinsäure eine Wechselwirkung noch möglich ist und diese durch das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des Zielmoleküls des Aptamers wieder aufgehoben werden kann, in dem Sinne, daß das Aptamer von dem Hairpin-Ribozym abdissoziiert.

In Fig. 16 sind verschiedene entsprechende Sequenzpaare aufgeführt, wobei Ribozym denjenigen Teil bezeichnet, der komplementär, oder zumindest teilweise komplementär zum Aptamer, oder einer Teilsequenz davon, ist. Fehlpaarungen sind mit Pfeil bezeichnet, GU/A-, wobble-Basenpaare sind mit einem (*) bezeichnet. Die Sequenzen sind nochmals als SEQ ID No. 10 bis SEQ ID No. 17 dargestellt.

Als weitere FMN-Aptamer-Sequenz wurde die folgende Sequenz FMNapt4 (SEQ ID No. 18) für die Konstruktion von Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozymen verwendet:

Das vorstehend am Beispiel eines FMN-Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozyms wird im folgenden nochmals am Beispiel eines Trombin-bindenden Aptamers veranschaulicht, wie dargestellt in Fig. 17.

Als Thrombin-Sequenzen wurden dabei die in SEQ. ID No. 19 und 20 dargestellten Sequenzen aus Deoxynukleotiden verwendet. Als Hairpin-Ribozym FT1 und FT2 wurden die in den Sequenzen SEQ. ID No. 21 und SEQ. ID No. 22 dargestellten Sequenzen verwendet, die zum einen einen zu den Thrombin-Sequenzen zumindest teilweise komplementären Bereich enthalten und im Falle des Ribozyms FT1 darüber hinaus noch die Brücken-Sequenz aus Konstrukt F83 enthalten. Die Sequenzen sind in Fig. 18 dargestellt.

Beispiel 8: Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von potentiellen Wirkstoffen unter Verwendung von Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozymen

Das in Beispiel 7 beschriebene Aptamer-regulierte Antisense-Hairpin-Ribozym kann verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die die Wechselwirkung zwischen einem Zielmolekül und dem gegen dieses Zielmolekül gerichtete Aptamer beeinflusst und beispielsweise unterbindet. Infolge dieser Wechselwirkung ist eine derartige Verbindung, hierin als auch Kandidaten-Verbindung bezeichnet, ein potentieller Wirkstoff, insbesondere dann, wenn das Zielmolekül an einem biologisch und insbesondere pathologisch relevanten Prozess beteiligt ist. Darüber hinaus können aufgrund der Tatsache, dass die Verbindung mit dem Zielmolekül wie beispielsweise einem Protein wechselwirkt, Rückschlüsse hinsichtlich der allgemeinen Struktur von Verbindungen gezogen werden, die mit dem besagten Zielmolekül in Wechselwirkung treten. Der grundsätzliche Ablauf eines derartigen Screening-Verfahrens ist in Fig. 19 dargestellt.

Ausgehend von dem in Beispiel 7 beschriebenen Aptamer-regulierten Antisense-Hairpin-Ribozym (1) wird zu einem Reaktionsansatz ein FRET-Substrat hinzugegeben. Dieses Substrat bindet an das Hairpin-Ribozym und es kommt zur Ausbildung des Loops A. Der Bereich des Hairpin-Ribozyms, der eine Sequenz umfasst, die zumindestens teilweise zu mindestens einem Teil der Aptamer-spezifischen Sequenz komplementär ist (anti-APT), erlaubt die Ausbildung eines katalytisch aktiven Hairpin-Ribozyms mit der Folge, dass in Loop A das FRET-Substrat gespalten wird und infolgedessen bei Einstrahlung mit einer geeigneten Anregungswellenlänge die Fluoreszenz nicht gelöscht wird, sondern vielmehr es zu einer Emission von Fluoreszenzstrahlung kommt. In einem weiteren Schritt wird sodann das für ein jeweiliges Zielmolekül spezifische Aptamer dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Gemäß dem in Beispiel 7 beschriebenen Mechanismus kommt es durch Annelierung des Aptamers an den Bereich des Hairpin-Ribozyms, der die Antisense-Nukleinsäuresequenz aufweist, und zur Ausbildung einer gestreckten Konformation des Hairpin-Ribozyms, in der das Hairpin-Ribozym nicht mehr katalytisch aktiv ist. Demzufolge kommt es zu keiner Spaltung des FRET-Substrates und damit zu keiner Emission von Fluoreszenzstrahlung trotz Einstrahlen einer geeigneten Anregungswellenlänge (3).

Wird das Zielmolekül zum Reaktionsansatz hinzugegeben, kommt es zu einer Kompetition des Aptamers mit dem Zielmolekül einerseits und dem Hairpin-Ribozym andererseits. In Abhängigkeit von den kinetischen Bedingungen wird ein mehr oder weniger großer Anzahl der an das Hairpin-Ribozym annelierten Aptermoleküle mit dem Zielmolekül in Wechselwirkung treten und das Ribozym infolgedessen von der gestreckten Konformation wieder in die katalytisch aktive Konformation übertreten. Damit wird eine Spaltung des Substratmoleküls wieder möglich und es tritt eine Fluoreszenz-Strahlung bei geeigneter Anregungsstrahlung auf (4). Wird nun in einem nächsten Schritt eine Kandidaten-Verbindung, entweder einzeln oder zusammen mit weiteren Kandidaten-Verbindungen, bspw. aus einer Substanzbibliothek, dem Reaktionsansatz zugesetzt, so kann es, für den Fall, dass die Verbindung oder ein Element aus der Verbindungsbibliothek mit dem Zielmolekül in Wechselwirkung tritt, zu einer Freisetzung des an das Aptamer gebundenen Zielmoleküls kommen, mit der Folge, dass das Aptamer wiederum für eine Wechselwirkung mit dem Ribozym zur Verfügung steht und entsprechend an den zum Aptamer komplementären Teil des Ribozyms zwischen Loop A und Loop B bindet und somit das Hairpin-Ribozym wiederum in seine gestreckte Konformation überführen, in der das Hairpin-Ribozym nicht katalytisch aktiv ist und infolgedessen es zu einer Löschung der Fluoreszenz bei Verwendung eines FRET-Substrates kommt (5).

Beispiel 9: Verfahren zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungspartnern

Das in Beispiel 7 für Thrombin beschriebene Aptamer-regulierte Hairpin-Ribozym kann auch verwendet werden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Zielmolekül, im vorliegenden Falle Thrombin, und einem damit in Wechselwirkung tretenden Polypeptid oder Protein zu bestimmen.

Der grundsätzliche Ablauf dieses Verfahrens ist in Fig. 20 dargestellt, wobei neben dem Aptamer-regulierten Hairpin-Ribozym (AHP) auch ein Aptamer-reguliertes Hammerhead-Ribozym (AHH) beschrieben ist, die jeweils durch das gegen Thrombin gerichtete Aptamer (das „Anti-Thrombin-Aptamer“) in ihrer Aktivität beeinflusst werden können. Dabei kommt es bei Anwesenheit des Anti-Thrombin-Aptamers zu keiner Spaltung des Ribozym-Substrates infolge einer Wechselwirkung bzw. Komplexbildung zwischen dem als allosterischen Regulator dienenden Anti-Thrombin-Aptamer und der in den Ribozymen enthaltenen dazu

komplementären Sequenz, die hierin auch als Antisense-Sequenzen bezeichnet wird, des Anti-Thrombin-Aptamers. Bei Anwesenheit des Zielmoleküls, im vorliegende Falle des Thrombins, wird sich das Anti-Thrombin-Aptamer von den Ribozymen lösen und einen Komplex mit dem Zielmolekül ausbilden. Infolgedessen können die Ribozyme eine Konformation einnehmen, die die katalytische Aktivität des Ribozyms bereitstellt bzw. erhöht und infolge dessen kommt es zu einer Spaltung des Substrates und, bei Vorliegen eines FRET-Systems, wie hierin verwendet, zur Erzeugung eines Fluoreszenz-Signals.

Wird zu dem Komplex aus Aptamer und Protein, im vorliegenden Falle Anti-Thrombin-Aptamer und Thrombin, ein potentieller Wechselwirkungspartner, d. h. ein potentieller Thrombin-Wechselwirkungspartner, hinzugegeben, wird das Anti-Thrombin-Aptamer aus dem Komplex entfernt und kann wieder mit den Ribozymen in Wechselwirkung treten mit der Folge, dass erneut ein Komplex mit der in den Ribozymen enthaltenen Antisense-Sequenz ausgebildet wird und infolge dessen die katalytische Aktivität der Ribozyme verringert bzw. eingestellt wird. Die jeweilige, mit dem Zielmolekül in Verbindung tretende Verbindung kann sodann isoliert, chemisch/physikalisch charakterisiert und/oder identifiziert werden.

Es ist somit unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich, eine Protein-Protein-Wechselwirkung zu bestimmen bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungspartner zu identifizieren, wobei anstelle der Proteine auch Polypeptide, Fragmente von Proteinen oder Domänen von Proteinen jeweils und unabhängig voneinander verwendet werden können. Die Kenntnis des Epitops des Zielmoleküls, das durch das Aptamer erkannt wird, erlaubt die Identifizierung der relevanten Domänen, die bei der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül auf Seiten des Wechselwirkungspartners beteiligt ist.

Bei dem in Fig. 20 dargestellten Reaktionsschema ist die Antisense-Sequenz der Ribozyme in Fettdruck dargestellt. Die Fluoreszenz-Markierung FAM wird als F bezeichnet, der Fluorescence-Quencher Q ist N, N' Tetramethylrhodamin (TAMRA).

Bei dem hierin konkret beschriebenen Beispiel wurden die im folgenden detaillierter beschriebenen Experimente in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen von Hirudin durchgeführt, wobei Hirudin als Thrombininhibitor verwendet wurde. Hirudin bindet an die Exo-Stelle I von Thrombin und ist somit ein Wechselwirkungspartner im vorstehenden Sinne.

Die experimentellen Bedingungen waren dabei die folgenden:

Äquimolare Komplexe aus AHH/ α -Thrombin (30nM/30nM) oder AHP/ α -Thrombin (50nM/50nM) wurden für 5 min bei 32°C in Hammerhead-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7,9, 25 mM NaCl) oder Hairpin-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5) respektive mit 200 nM AHH-Substrat, bzw 1 μ M AHP-Substrat vorinkubiert. Nach der optionalen Zugabe von Effektoren : 50 nM anti-Thrombin DNA-Aptamer, 1 μ M α -Thrombin oder 1 μ M Kontrollproteine (vgl. Fig. 22) 1. Humanes γ -Thrombin; 2. NF κ B p52; 3. humanes α -Thrombin; 4. Bcl-3; 5. Cytohesin-1; 6. Rev-protein of HIV-1; 7. Rinderserumalbumin; 8. Papain; 9. Lysozyme; 10. ADH (Alkohol Dehydrogenase); 11. Hirudin; 12. Antithrombin III) wurden die Reaktionen für weitere 10 min bei 32°C inkubiert. Die Spaltungsreaktionen wurden durch Zugabe von 8mM MgCl₂ (AHH) oder 20mM MgCl₂ gestartet. Die initiale Fluoreszenz/min wurde durch Subtraktion der Werte von Reaktionen ohne Ribozym korrigiert. Die Fluoreszenzmessungen durch Anregung bei 489 nm and Beobachten der FAM-Emission bei 520 nm wurden mit dem Fluoreszenzauslesegerät Ascent Fluoroscan FL durchgeführt.

Das verwendete Aptamer ist ein DNA-Aptamer, welches an die Exo-Stelle I des menschlichen Thrombins mit einem K_D von 20 nM bindet und die folgende Sequenz aufweist 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3'

Die Ergebnisse sind in den Figs. 21 A, 21 B und 22 dargestellt.

Die in Fig. 21 A und 21 B gezeigten Ergebnisse für die verschiedenen verwendeten, allosterisch regulierbaren Ribozyme bestätigen, dass grundsätzlich eine jede Form von allosterisch regulierbarem Ribozym erfindungsgemäß verwendet werden kann, sei es nun ein Hammerhead-Ribozym oder ein Hairpin-Ribozym. Bei den in Fig. 21 A dargestellten Versuchen wurde das für Thrombin spezifische Hairpin-Ribozym in einer Konzentration von 30 nM verwendet. Die einzelnen Balken von Fig. 21 A geben das Ergebnis der verschiedenen Reaktionsansätze wieder, wobei Balken 1 die Fluoreszenz des Ribozyms ohne das Anti- α -Thrombin-Aptamer und Balken 2 die Fluoreszenz des Ribozyms nach Zugabe des Anti- α -Thrombin-Aptamers (äquimolares Verhältnis 1:1) zeigt. Äquimolare Mengen von Aptamer führten zur vollständigen Inhibierung des Hairpin-Ribozyms. Balken 3 zeigt das Ergebnis des Ansatzes aus Ribozym, Anti-Thrombin-Aptamer und γ -Thrombin (1:1:20), wobei γ -Thrombin die Exo-Stelle I von Thrombin fehlt und

somit nicht in der Lage ist, das Aptamer von dem Hammerhead-Ribozym abzulösen; Balken 4 zeigt das Ergebnis des Reaktionsansatzes aus Ribozym und Anti-Thrombin-Aptamer/ α -Thrombin (1:1:20), wobei hier eine 60%-ige Wiederherstellung der Hammerhead-Ribozymaktivität beobachtet wird.

Die in den Balken 5 bis 9 dargestellten Ergebnisse betreffen Reaktionen, die denjenigen entsprechen, deren Ergebnis mit dem Balken 4 dargestellt ist, wobei hier die Konzentration von Hirudin von 1 bis 20 μ M anstieg. Bei zunehmenden Konzentrationen kompetitiert Hirudin mit dem Aptamer um die Bindung an die Exo-Stelle I von α -Thrombin, was zur Freisetzung des Aptamers und damit zur Inhibierung der Ribozyme führt. Balken 10 zeigt das Ergebnis für die gleiche Reaktionsansatz, deren Ergebnis mit dem Balken 4 widergegeben ist, jedoch mit 20 μ M Exo-Stelle II-spezifischem Antithrombin III (ATIII). ATIII, das an die Exo-Stelle II von α -Thrombin bindet, zeigt keinerlei Wirkung.

Wie aus Fig. 21 B ersichtlich führt die Verwendung des Thrombin-spezifischen Hammerhead-Ribozyms bei einer Konzentration von 50 nM zu den gleichen Ergebnissen wie das Hammerhead-Ribozym. Die in den Balken 1 bis 10 dargestellten Ergebnisse entsprechen den Ansätzen, wie sie im Zusammenhang mit Fig. 21 A vorstehend diskutiert wurden, wobei die Mischung aus Ribozym/Anti-Thrombin-Aptamer/Thrombin 1:1:20 betrug. In beiden Systemen hatten α - und γ -Thrombin, Hirudin oder ATIII alleine keine Wirkung auf die Ribozyme oder auf die Kombination aus Ribozym und Aptamer.

Die in der vorstehenden Beschreibung, dem Sequenzprotokoll, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Allosterisch regulierbares Hairpin-Ribozym.
2. Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist, wobei die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure umfasst.
3. Polynukleotid umfassend ein Hairpin-Ribozym, wobei das Hairpin-Ribozym mindestens eine substratbindende Domäne A und eine katalytische Domäne B umfasst, wobei bei Kontakt der Domäne B mit der Domäne A die katalytische Aktivität begründet wird, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen Domäne A und Domäne B eine Domäne C angeordnet ist, wobei die Domäne C die Domänen A und B verbindet und eine zu einer ein Zielmolekül bindenden Nukleinsäure zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure umfasst.
4. Polynukleotid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest an einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure eine dazu zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure hybridisiert ist.
5. Polynukleotid nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Ribozym eine verringerte enzymatische Aktivität aufweist.
6. Polynukleotid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass an zumindest einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure das Zielmolekül gebunden ist.
7. Polynukleotid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass infolge der Bindung des Zielmolekül das Ribozym eine erhöhte enzymatische Aktivität aufweist.
8. Polynukleotid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest an einen Teil der die Domäne C ausbildenden Nukleinsäure eine dazu zumindest teilweise komplementäre Nukleinsäure hybridisiert ist.

9. Polynukleotid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Ribozym eine verringerte katalytische Aktivität aufweist.
10. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Substrat an das Polynukleotid gebunden ist, insbesondere an die substratbindende Domäne A.
11. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die ein Zielmolekül bindende Nukleinsäure ein Aptamer ist.
12. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 11 umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ.ID.No.1.
13. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 2 und 4 bis 12, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID No. 3 und SEQ ID.No. 5 umfasst.
14. Polynukleotid nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Brückensequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, die UG – UGC, UGG – GCU, UCGG – GCU und GGUG – UCGU umfasst.
15. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 3 bis 12, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die SEQ ID No. 21 und SEQ ID.No. 22 umfasst.
16. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 2 bis 15, weiter umfassend ein Ribozym-Substrat, insbesondere ein FRET-Substrat.
17. Polynukleotid nach einem der Ansprüche 2 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid und/oder das Ribozym-Substrat RNA, DNA oder Mischungen davon ist.
18. Biosensor umfassend ein allosterisch regulierbares Hairpin-Ribozym oder ein Polynukleotid nach einem der Ansprüche 2 bis 17.

19. Biosensor nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Polynukleotid und/oder das Hairpin-Ribozym und/oder das Ribozym-Substrat an einen festen Träger gebunden ist.

20. Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Polynukleotids nach einem der Ansprüche 2 bis 17 oder eines Hairpin-Ribozyms nach Anspruch 1,
- b) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- c) Hinzugeben einer Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure komplementär ist zu der ein Zielmolekül bindenden Nukleinsäure des Ribozyms,
- d) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- e) Hinzugeben eines Zielmoleküls, wobei das Zielmolekül mit der das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
- f) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- g) Hinzugeben einer Kandidaten-Verbindung,
- h) Bereitstellen eines Substrates für das Polynukleotid und Zugabe des Substrates zu dem Polynukleotid oder dem Reaktionsansatz,
- i) Bestimmen der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül.

21. Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die an ein Zielmolekül bindet, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Polynukleotids nach einem der Ansprüche 3 bis 17 oder eines Hairpin-Ribozyms nach Anspruch 1,
- b) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- c) Hinzugeben einer das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure,
- d) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- e) Hinzugeben des Zielmoleküls, wobei das Zielmolekül mit der das Zielmolekül bindenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
- f) Optional Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms,
- g) Hinzugeben einer Kandidaten-Verbindung,

- h) Bereitstellen eines Substrates für die katalytische Aktivität des Polynukleotids und Zugeben des Substrates zu dem Polynukleotid oder zum Reaktionsansatz,
- i) Bestimmen der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte c), e) und g) in ihrer Reihenfolge beliebig ausgetauscht werden können.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Bindung der Kandidaten-Verbindung an das Zielmolekül durch Bestimmen der katalytischen Aktivität des Ribozyms erfolgt.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat eine fluorophore und eine fluoreszenzlöschende Gruppe enthält und wobei nach Spaltung des Substrates durch die katalytischen Aktivität des Ribozyms oder der katalytischen Domäne die Löschung der Fluoreszenz unterbunden ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die fluorophore Gruppe 6-Carboxy-Fluorescein und die fluoreszenzlöschende Gruppe 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin oder Cy3 ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Zielmolekül ausgewählt ist aus der Gruppe, die kleine Moleküle, Polypeptide und Proteine sowie Fragmente davon umfasst.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Kandidaten-Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, die kleine Moleküle, Polypeptide und Proteine sowie Fragmente davon umfasst.

28. Arzneimittel umfassend eine nach einem der Ansprüche 20 bis 27 identifizierte Verbindung.

29. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 20 bis 27 umfassend:
- a) ein Polynukleotid nach einem der Ansprüche 2 bis 16 oder ein Hairpin-Ribozym nach Anspruch 1; und
 - b) ein signalgebendes Ribozym-Substrat.

1/13

Spaltungsstelle

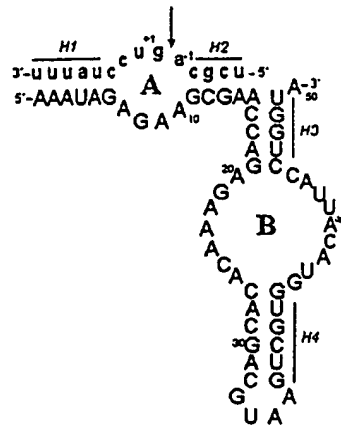


Fig. 1

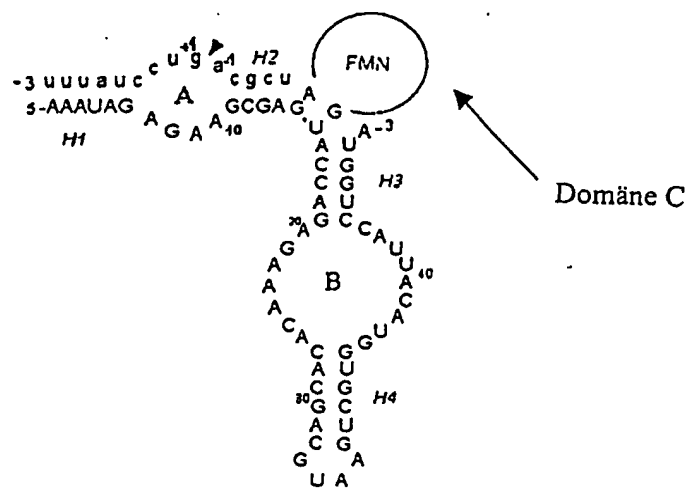
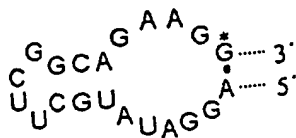


Fig. 2

F80

2/13

Fig. 3



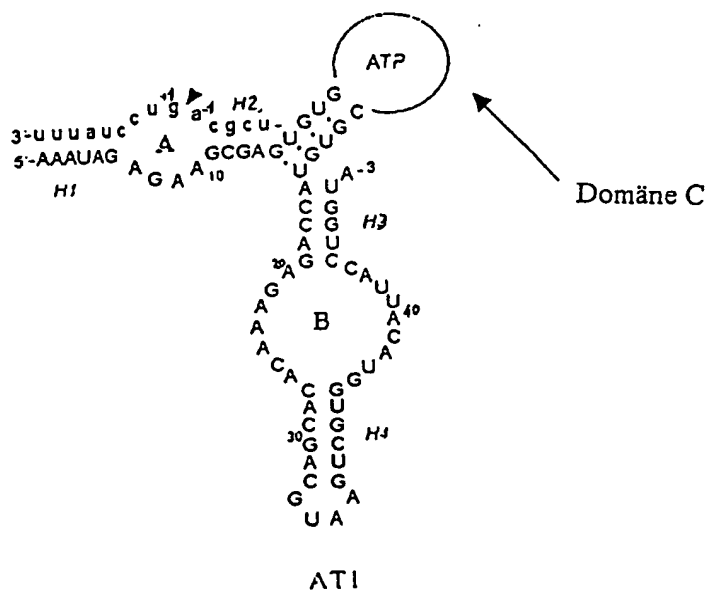
SEQ.ID.No.6

Fig. 4

F80 (80nt): 5'-AAAUAGAGAAGCGA G-FMN-Aptamer-Sequenz-U
 ACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCGUGGUACAUAUACCUGGUA-3'

SEQ.ID.No.3

Fig. 5

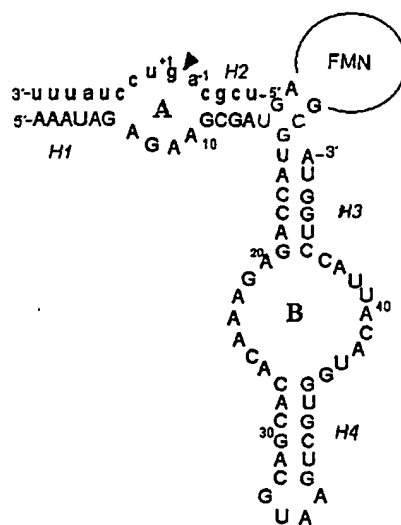


4/13

Fig. 8 Substrat (14nt): 5'-UCGCAGUCCUAUUU-3'

SEQ.ID.No.2

Fig. 9



F83

5/13

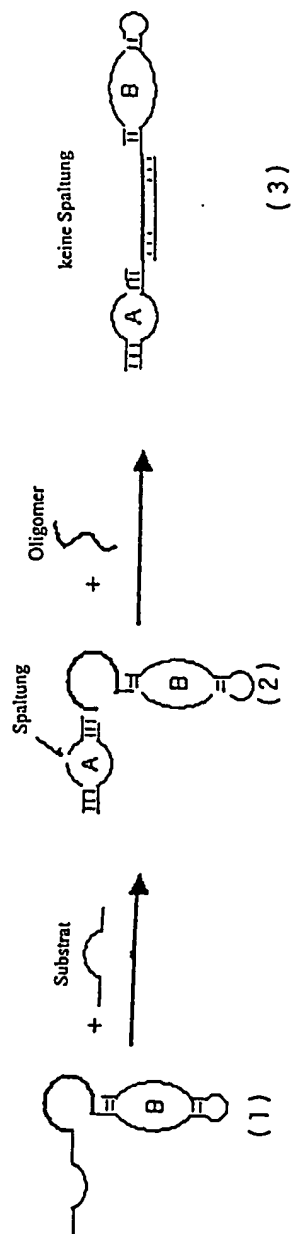


Fig. 10

6/13

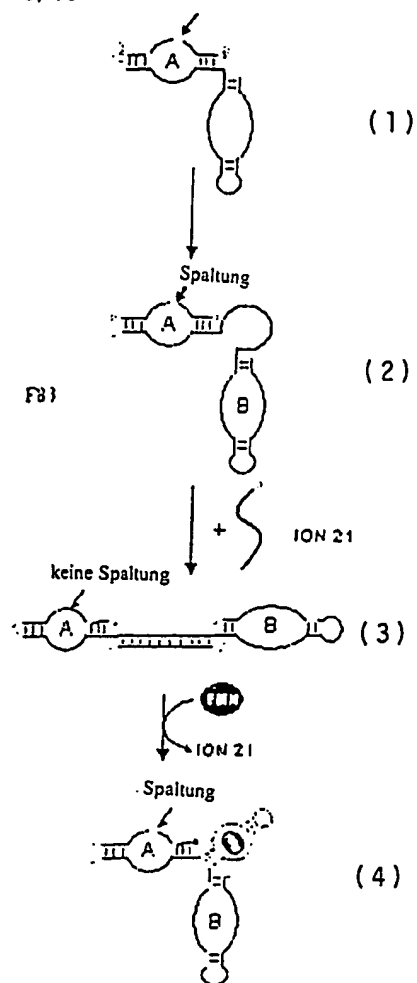


Fig. 11

FRET-Substrat : 5'-(TAMRA)UCGCAGUCCUAUUU(FAM)-3'

Fig. 12

7/13

1) ION21 (vollständig komplementär zur FMN-bindenden Aptamer-Bindungsstelle):

5'-CCTT CTGCCG AAGCATAT CCT-3'

SEQ.ID.No.7

2) ION14 (enthält sieben Fehlpaarungen):

5'-CCTTCACGCGAACGTAATCCT-3'

↑↑↑ ↑↑↑↑

SEQ.ID.No.8

3) ION17 (enthält vier Fehlpaarungen):

5'-CCTTCTGCCGTTTCGATATCCT-3'

↑↑↑↑

SEQ.ID.No.9

Fig. 13

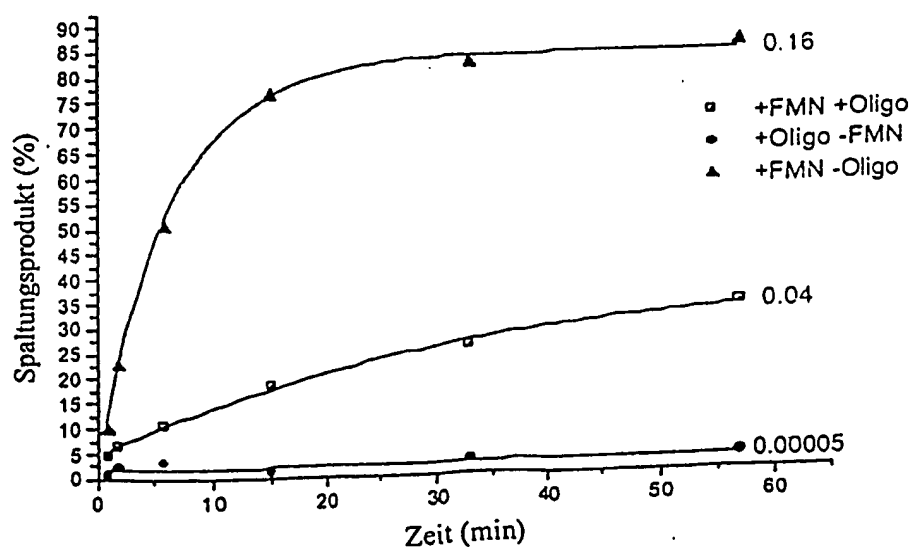


Fig. 14

8/13

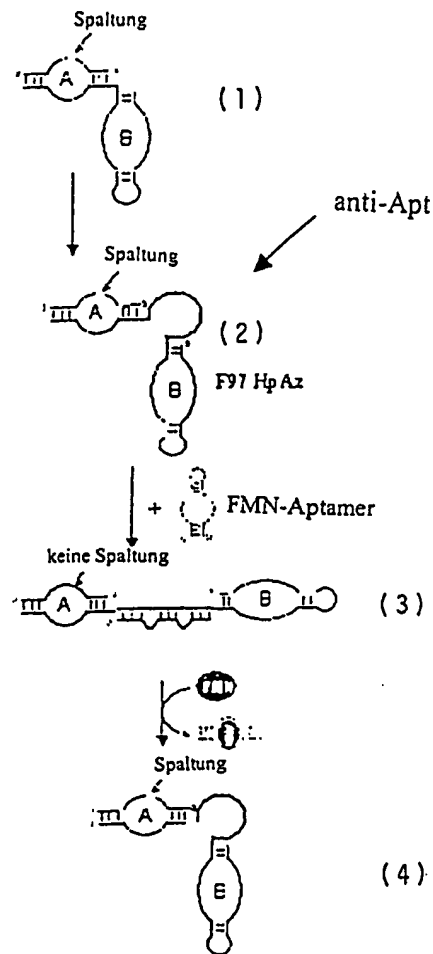


Fig. 15

- 1)
 Ribozym: 5'-...TGGGATUCCGULUGCCGAAGUAGAUUAGUCUCG...3' SEQ.ID.No.10
 Aptamer-6: 3'-CCCUGACGAAGACGGCUUCGUUAGGAUCACGG-5' SEQ.ID.No.11
- 2)
 Ribozym: 5'-...TGGGATUCCGULUGCCGAAGUAGA-A-UAGUCUCG...3' SEQ.ID.No.12
 Aptamer-6: 3'-CCCUGACGAAGACGGCUUCGUUAGG-AUCACGG-5' SEQ.ID.No.13
- 3)
 Ribozym: 5'-...TGGGATUC-A-UUGCCGAAGUAGA-A-UAGUCUCG...3' SEQ.ID.No.14
 Aptamer-6: 3'-CCCUGACGAAGACGGCUUCGUUAGG-AUCACGG-5' SEQ.ID.No.15
- 4)
 Ribozym: 5'-...TGGGATUC-AC-UUGCCGAAGUAGA-A-UAGUCUCG...3' SEQ.ID.No.16
 Aptamer-6: 3'-CCCUGACGAAGACGGCUUCGUUAGG-AUCACGG-5' SEQ.ID.No.17

Fig. 16

9/13

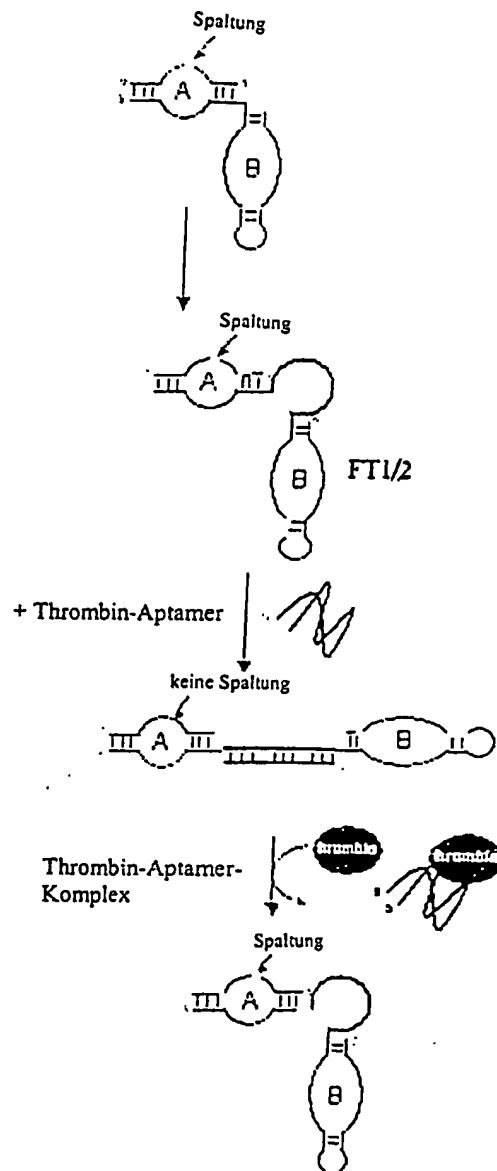


Fig. 17

FT1 (enthält die F83-Brückensequenz):

5'-
 AAUAGAGAAGCGA UGCCAACACACCAACCCGUACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCG
 UGGUACA UUACCUGGUA-3' SEQ. JD. No. 21

FT2:

5'-
 AAUAGAGAAGCGA CCAACACACCAACCGUUGGACCAGAGAAACACACGACGUAAGUC
 GUGGUACA UUACCUGGUA-3' SEQ. JD. No. 22

Fig. 18

10/13

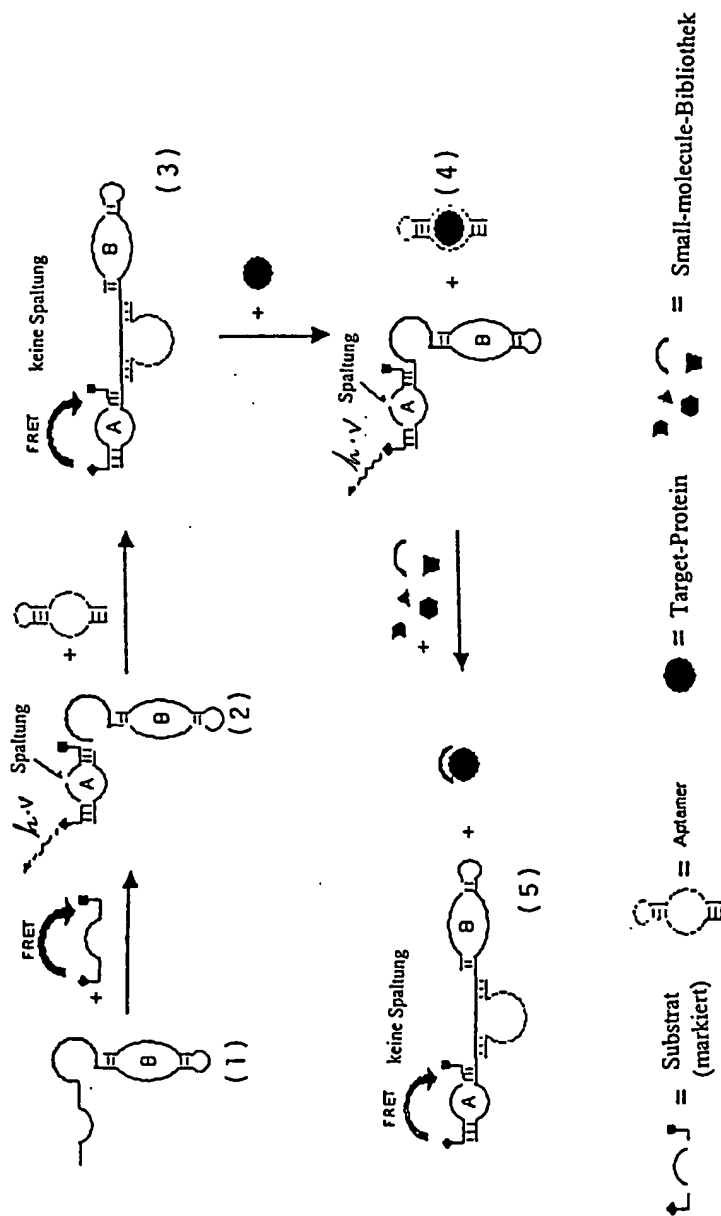


Fig. 19

11/13

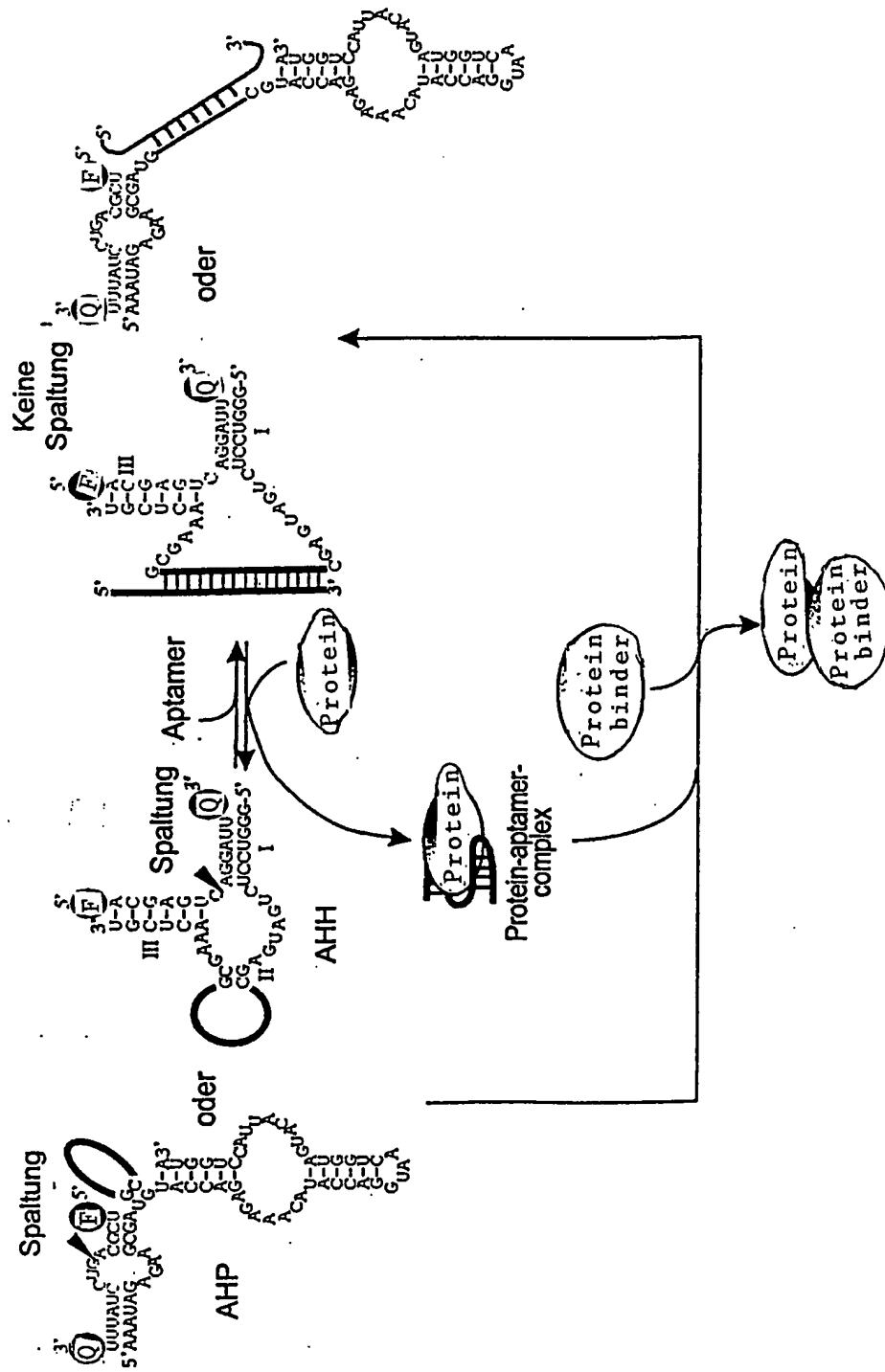


Fig. 20

12/13

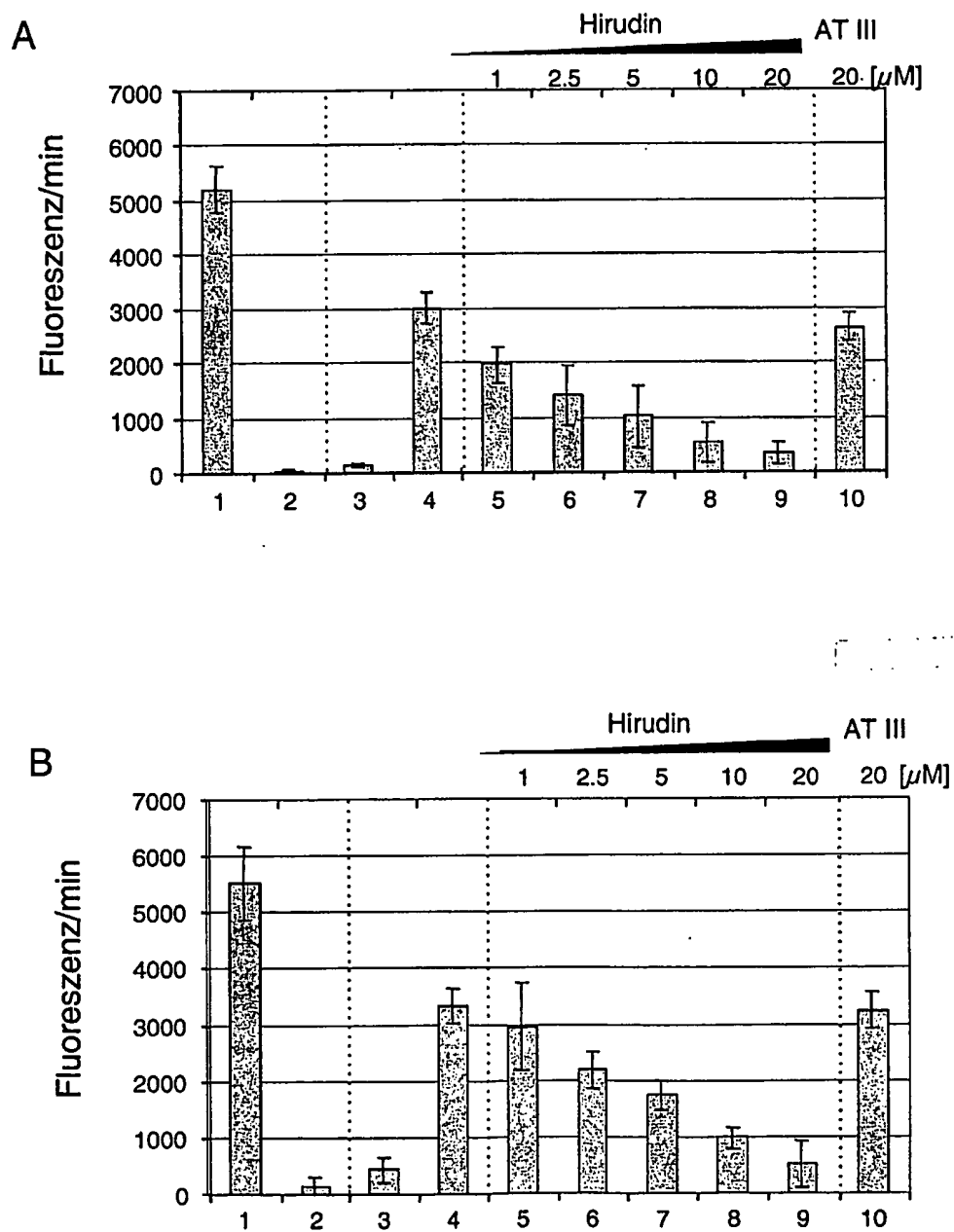


Fig. 21

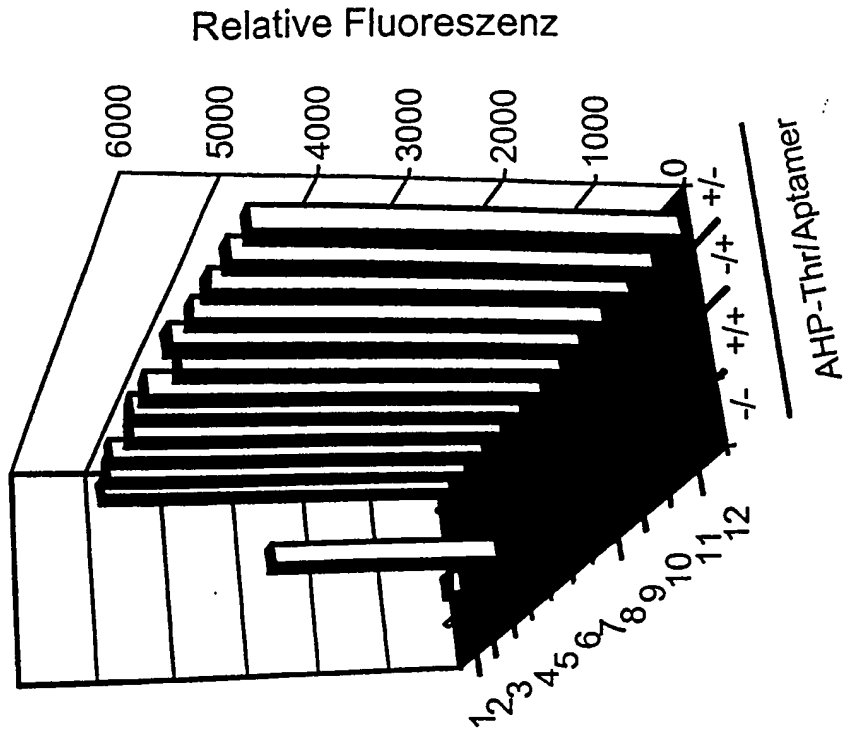


Fig. 22

- 1. γ -Thrombin
- 2. p52
- 3. α -Thrombin
- 4. Bcl3
- 5. Cytohesin -1
- 6. HIVRev
- 7. BSA
- 8. Papain
- 9. Lysozym
- 10. ADH
- 11. Hirudin
- 12. AT III

SEQUENZPROTOKOLL

<110> NascaCell GmbH

<120> Verfahren zum Screenen von Inhibitoren für die
Protein-Protein-Wechselwirkung
sowie Ribozyme hierzu

<130> N 19013 PCT

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 57

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Haarnadel-Ribozym wtHpRz

<400> 1

aaauagagaa gccaaccaga gaaacacacg acguaagucg ugguacauua ccuggua 57

<210> 2

<211> 14

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Substrat

<400> 2

ucgcaguccu auuu 14

<210> 3

<211> 80

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Haarnadel-Ribozym F80

<400> 3

aaauagagaa gcgagaggau augcuucggc agaagguacc agagaaacac acgacguaag 60
ucgugguaca uuaccuggua 80

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: ATP-Aptamer

Position 5 (5'-Ende) bis 34 (3'-Ende)

<400> 4
gggaagaaac tgtggcactt cggtgccagc 30

<210> 5
<211> 95
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
Haarnadel-Ribozym AT1

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Haarnadel-Ribozym AT1

<400> 5
aaauagagaa gcgagugugg gaagaaactg tggcacttcg gtgccagcgu guaccagaga 60
aacacacgac guaagucgug guacauuacc uggua 95

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FMN-Aptamer
Position 1 (5'-Ende) bis 21 (3'-Ende)

<400> 6
aggauaugcu ucggcagaag g 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
DNA-Oligo-Effektor ION21

<400> 7
ccttctgccg aagcatatcc t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
DNA-Oligo-Effektor ION 14

<400> 8
ccttcacgcg aacgtaatcc t 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
DNA-Oligo-Effektor ION17

<400> 9
ccttctgccg ttcgatatcc t

21

<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<400> 10
tggaauccg uuugccgaag uagaucuuag ucucg

35

<210> 11
<211> 33
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FMN-Aptamer

<400> 11
gggacuagga uaugcuucgg cagaaggagu ccc

33

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<400> 12
tggaauccg uuugccgaag uagaauaguc ucg

33

<210> 13
<211> 33
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FMN-Aptamer-6

<400> 13

gggacuagga uaugcuucgg cagaaggagu ccc

33

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Annealingregion des Haarnadel-Ribozyms F97

<400> 14

tgggauucac uugccgaagu agaauagucu cg

32

<210> 15

<211> 33

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FMN-Aptamer-6

<400> 15

gggacuagga uaugcuucgg cagaaggagu ccc

33

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:
Annealing-Region des Haarnadel-Ribozyms F97

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Annealingregion des Haarnadel-Ribozyms F97

<400> 16

tgggauucac uugccgaagu agaauagucu cg

32

<210> 17

<211> 33

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FMN-Aptamer-6

<400> 17

gggacuagga uaugcuucgg cagaaggagu ccc

33

<210> 18

<211> 31

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
FMN-Aptamer-4

<400> 18

ggguagga uaugcuucgg cagaaggaca c

31

<210> 19

<211> 15

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Thrombin-Aptamer

<400> 19

ggttggtgtg gttgg

15

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Thrombin-Aptamer

<400> 20

ccaacggttg gtgtggttg

20

<210> 21

<211> 77

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Ribozym FT1

<400> 21

aaauagagaa gcgaugccaa ccacaccaac ccguaccaga gaaacacacg acguaagucg 60
ugguacauua ccuggua 77

<210> 22

<211> 77

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Ribozym FT2

<400> 22

aaauagagaa gcgaccaacc acaccaaccg uggaccaga gaaacacacg acguaagucg 60

ugguacauua ccuggua

77

1

5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.